



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**OBTENCIÓN DE ÁCIDO FERÚLICO A PARTIR DE UN  
CONCENTRADO DE LA HIDRÓLISIS ALCALINA DEL  
MAÍZ**

---

Por:

**MOISÉS IGNACIO PACHECO**

TESIS APROBADA POR LA

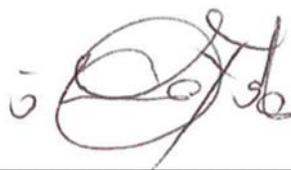
**COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis del Ing. Bioquímico **Moisés Ignacio Pacheco**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



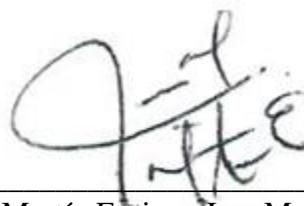
---

Dr. Ali Jesús Asaff Torres  
Director de Tesis



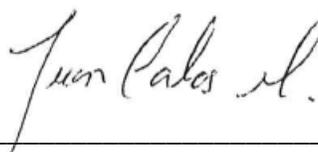
---

Dra. Yolanda Reyes Vidal  
Asesor



---

Dr. Martín Enrique Jara Marini  
Asesor



---

Dr. Juan Carlos Mateos Díaz  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por el apoyo económico prestado durante estos dos años.

**Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD)**, por permitirme formar parte de su programa de posgrado y llevar a cabo mis estudios de maestría.

**Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ)**, por brindarme sus instalaciones y apoyo técnico para la realización de una parte fundamental de mi trabajo de tesis.

A mi **Director de Tesis, Dr. Ali Asaff Torres** por haberme permitido ser parte de su grupo, por su contribución al trabajo de investigación, por sus consejos, apoyo y amistad.

A mi **Comité de Tesis, Dra. Yolanda Reyes Vidal, Dr. Juan Carlos Mateos Díaz, Dr. Martín Jara Marini** por su apoyo, consejos y contribución a este trabajo de investigación.

A la **Coordinación de Ciencia de los Alimentos**, por su respaldo académico y administrativo otorgado.

A los miembros del **Laboratorio de Biotecnología Industrial**, del CIATEJ por su apoyo que me brindaron durante mi estancia, nuevamente al Dr. Juan Carlos Mateos Díaz, Dra. Rosa María Camacho Ruíz, Dr. Jorge Alberto Rodríguez González, a los compañeros Hiram, Mariana, Daniel, Fabiola, Priscila y Noé, por su valiosa y sincera amistad, y al **Laboratorio de Biotecnología Alimentaria**, en especial al M.C. Gustavo Adolfo Castillo Herrera y al Tec. Abiel Alba Rangel por su apoyo en el préstamo del equipo de extracción supercrítico.

**A todas aquellas personas que colaboraron en el desarrollo de este trabajo,** ya que gracias a sus buenos comentarios, consejos y sugerencias, me permitieron elaborar mi proyecto de tesis; y a todas aquellas personas que no se mencionan aquí pero que directa o indirectamente me ayudaron a elaborar este trabajo, les agradezco todo lo que hicieron por mí.

## DEDICATORIA

Legado el final de un esfuerzo durante mi posgrado, se hace difícil expresar, en unos cuantos párrafos, la dedicatoria a quienes de una u otra manera me han ayudado a recorrer este camino, que a menudo las palabras no reflejan con suficiente claridad los sentimientos de reconocimiento, respeto y afecto que quiera transmitir. No obstante, quisiera poner en ello todo mi empeño para conseguirlo.

Este trabajo se lo dedico a mi **Familia**, especialmente a mis padres maravillosos, María Elena Pacheco Lorenzo y Obdulio Ignacio García que, así como mis hermanos Dagoberto, Baltazar, Adalid y Roberto, unidos ellos fueron el motor para que yo siguiera adelante siempre, sus buenos deseos y consejos, han sido fundamentales para lograr mis objetivos, mi familia me dio la fuerza y motivación suficiente para lograr esta meta importante en mi vida, ellos me enseñaron a no rendirme, me dieron principios y educación para enfrentar a la vida de la mejor forma, por eso y mucho más les estaré eternamente agradecidos, gracias a ustedes soy lo que soy. ¡¡¡ Los quiero mucho!!!

A mis **Amigos** que siempre han estado al pendiente de mí, aunque los abandone mucho, pero créanme, valdrá la pena.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tablas.....	xi
Resumen.....	xii
Abstract.....	xiv
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
2.1 Ácido Ferúlico.....	3
2.1.1. Origen.....	3
2.1.2. Propiedades Fisicoquímicas.....	3
2.1.3. Aplicaciones.....	4
2.1.4. Obtención del Ácido Ferúlico.....	6
2.1.4.1. A partir de residuos de arroz.....	6
2.1.4.2. A partir de residuos de maíz.....	6
2.1.4.3. A partir de <i>ferula asafoetida</i> .....	7
2.1.4.4. A partir de otros residuos vegetales.....	7
2.1.4.5. Por síntesis química.....	7
2.2. Concentrado de Hidrolizados Alcalinos de Maíz como Nueva Fuente de Ácido Ferúlico.....	8
2.2.1. Generalidades.....	8
2.2.2. El Nejayote como Subproducto del Proceso de Nixtamalización.....	8
2.2.3. Uso de Sistemas de Membranas para el Manejo del Nejayote.....	11
2.3. Desarrollo de un Nuevo Método de Obtención de Ácido Ferúlico a partir del Concentrado de Nejayote.....	13
2.3.1. Secado por Aspersión.....	13
2.3.1.1. Generalidades.....	13
2.3.1.2. Parámetros de proceso.....	14
2.3.2. Proceso de Extracción Sólido-Líquido: Lixiviación.....	15

## CONTENIDO (continuación)

	<b>Página</b>
2.3.2.1. Generalidades.....	15
2.3.2.2. Parámetros de proceso.....	15
2.3.2.3. Extracción con fluidos supercríticos.....	17
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>20</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>21</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
5.1. General.....	22
5.2. Específicos.....	22
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
6.1. Muestreo del Nejayote.....	23
6.2. Preparación del Nejayote.....	23
6.3. Preparación del Hidrolizado Concentrado.....	23
6.4. Análisis Fisicoquímicos.....	25
6.4.1. Sólidos Solubles Totales.....	25
6.4.2. Cenizas.....	25
6.4.3. Material Total Extraíble por Solventes.....	25
6.4.4. Azúcares Reductores.....	26
6.4.5. Fenoles Totales.....	27
6.4.6. Cuantificación de Ácido Ferúlico por Cromatografía de Convergencia de Ultra Desempeño (UPC <sup>2</sup> ).....	27
6.5. Secado por Aspersión.....	28
6.5.1. Secador de Laboratorio.....	28
6.5.2. Secador de Piloto.....	29
6.6. Extracción Sólido-Líquido o Lixiviación del Ácido Ferúlico.....	29
6.6.1. Materia Prima.....	29
6.6.2. Con Solventes Convencionales.....	29

## CONTENIDO (continuación)

	<b>Página</b>
6.6.3. Con CO <sub>2</sub> en Estado Supercrítico.....	30
6.6.4. Análisis Estadístico.....	31
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
7.1. Etapa 1: Caracterización Físicoquímica de la Mezcla de los Hidrolizados Concentrados de Nejayote Obtenidos por Membranas de Diferente Corte.	32
7.1.1. Parámetros Físicoquímicos.....	32
7.2. Etapa 2: Estabilización del Hidrolizado Concentrado a través del Secado por Aspersión.....	33
7.2.1. Efecto del pH sobre las Características Físicoquímicas del Producto Deshidratado.....	33
7.2.2. Efecto de la Escala de Secado sobre el Rendimiento y las Características Físicoquímicas del Producto Deshidratado.....	35
7.2.3. Efecto de la Temperatura de Almacenamiento sobre las Características Físicoquímicas del Producto Deshidratado.....	38
7.3. Etapa 3. Selección del Solvente para la Lixiviación Selectiva del Ácido Ferúlico.....	40
7.3.1. Efecto del pH sobre la Lixiviación del Ácido Ferúlico con Diferentes Solventes.....	40
7.3.2. Elección del Solvente para la Lixiviación Selectiva del Ácido Ferúlico.....	43
7.3.3. Lixiviación del Ácido Ferúlico con CO <sub>2</sub> en Estado Supercrítico.....	45
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>48</b>
<b>IX. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>X. REFERENCIAS.....</b>	<b>50</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química del ácido ferúlico <i>cis</i> (a) y ferúlico <i>trans</i> (b).....	4
2. Esquema del método y sistema de membranas para el manejo del nejayote.....	12
3. Diagrama de temperatura versus presión de una sustancia para conocer las condiciones de punto triple y punto crítico.....	18
4. Aspecto de los deshidratados obtenidos, previo ajuste de pH a diferentes niveles de los hidrolizados concentrados. El proceso de secado se realizó a temperatura del aire de entrada y salida de 125 y 60 °C, respectivamente.....	34
5. Cámaras de secado de los equipos utilizados mostrando la presencia de producto adherido a sus paredes.....	36
6. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el color de los productos deshidratados. Productos provenientes de: a) Tortillería almacenado a 4°C; b) Tortillería almacenado a 25 °C; c) Harinera industrial almacenado a 4 °C y d) Harinera industrial almacenado a 25 °C.....	39
7. Efecto del pH sobre la lixiviación del AF a partir de muestras deshidratadas con solventes de diversa polaridad.....	40
8. Extracción con diferentes solventes de un producto (pH en solución 4.7), resultante de la mezcla de los productos deshidratados obtenidos a escala piloto (alícuotas del mismo peso), a partir de nejayote provisto, tanto por la tortillería, como por la harinera industrial.....	41
9. Efecto sobre la lixiviación del AF con solventes de alta polaridad de muestras formuladas con los principales constituyentes del nejayote y sobre una muestra un producto (pH en solución 4.7), resultante de la mezcla de los productos deshidratados obtenidos a escala piloto (alícuotas del mismo peso), a partir de nejayote provisto, tanto por la tortillería, como por la harinera industrial.....	42
10. Extractos obtenidos por el sistema supercrítico del concentrado de nejayote deshidratado.....	47

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Composición del nejayote.....	9
2. Relación de volúmenes tratados y de los concentrados obtenidos de las diferentes muestras de nejayote, con los tipos de membranas utilizados.....	24
3. Matriz de diseño para estudiar la extracción con CO <sub>2</sub> en estado supercrítico.....	30
4. Características fisicoquímicas del concentrado de nejayote líquido por empresas después del tratamiento por los sistemas de membranas.....	32
5. Comparación del rendimiento de concentrado de nejayote deshidratado entre el proceso de secado por aspersión a tipo de escala, laboratorio y piloto.....	35
6. Parámetros fisicoquímicos de los productos deshidratados obtenidos mediante equipos de diferente escala a partir de concentrados provenientes de nejayote de diferentes fuentes.....	36
7. Caracterización fisicoquímica de los productos de concentrados de nejayote deshidratados almacenados durante 4 meses a 25 y 4 °C....	38
8. Caracterización fisicoquímica del producto deshidratado utilizado para las pruebas de elección del solvente.....	44
9. Lixiviación con diferentes solventes de un concentrado deshidratado proveniente del nejayote para la recuperación de AF...	44
10. Contenido de AF en los extractos obtenidos concentrado de nejayote deshidratado con CO <sub>2</sub> en estado supercrítico.....	46

## RESUMEN

El salvado de maíz es rico en componentes fenólicos, constituyendo aproximadamente un 4% de su peso seco. Dentro de los componentes fenólicos el ácido ferúlico, es el mayoritario (AF). Entre el 80-95% de la cantidad total de AF, se encuentra entrecruzado a polisacáridos, y el resto en forma conjugada con mono u oligosacáridos o en forma libre.

El AF es un compuesto fenólico que está presente en los tejidos vegetales, se encuentra en el salvado de trigo, frutas enteras, cítricos, plátano, café, jugo de naranja, berenjena, bambú, remolacha, repollo, espinacas, brócoli, extractos de hierbas y especias.

Fue aislado por primera vez en 1866 de una resina comercial y posteriormente se sintetizó químicamente en 1925; sin embargo, sus efectos biológicos fueron reportados hasta 1970, cuando investigadores japoneses descubrieron las propiedades antioxidantes de un extracto de aceite de arroz. En los últimos 10 años ha ido en aumento, la extracción, identificación y cuantificación, considerando el gran potencial de aplicación en las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentos.

El contenido de fenoles en las diferentes matrices vegetales se ha determinado por hidrólisis directa del material en estudio y seguido con la extracción con disolventes orgánicos. La identificación y cantidad extraída de componentes fenólicos son dependientes a la técnica de extracción y al tipo de solvente utilizado.

Considerando las aplicaciones de los compuestos fenólicos en las industrias, se han abierto mayores oportunidades de negocios, sobre todo en la búsqueda de nuevas fuentes y procesos más eficientes en la obtención del AF.

Con el propósito de ser competitivos y la necesidad de desarrollar procesos más eficientes para la producción de AF, recientemente el grupo de trabajo de Biotecnología Industrial del CIAD, desarrolló una patente en la que se implementó un tratamiento al nejayote (residuo acuoso alcalino de la producción de la tortilla o harina de maíz nixtamalizado), para concentrar el AF a través de membranas de nanofiltración hasta ósmosis inversa.

En este trabajo se planteó como objetivo, integrar un proceso para la recuperación de AF a partir de un concentrado hidrolizado obtenido del tratamiento por membranas del nejayote, en el que se establezcan las condiciones más óptimas de secado por aspersion y

de lixiviación, mediante el uso de equipos de escalamiento industrial (nivel laboratorio y planta piloto) y de solventes selectivos, incluyendo el CO<sub>2</sub> en estado supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>), respectivamente.

Se encontró que el aumento del pH facilitó el proceso de secado, obteniendo altos rendimientos (4.2 de AF a pH 9.0 contra 1.2% a pH 2.0), mientras que la extracción a nivel laboratorio fue más eficiente en la extracción de AF respecto a nivel piloto. En cuanto a los solventes, el AcOEt (acetato de etilo) al 95% y AcOEt:HCl al 99% fueron los que produjeron las mayores concentraciones de AF y la más alta selectividad, pero comparado con la lixiviación con SC-CO<sub>2</sub> tiende a ser mayor la selectividad, sin embargo, el rendimiento de AF es menor. Los materiales secados fueron sometidos a almacenamientos de 120 días, entre temperaturas de 4 y 25 °C (temperatura ambiente), donde no se observaron efectos negativos en cuanto a las características químicas (misma concentración de AF, 4.2% a tiempo 0 contra 4.18% a los 120 días), pero si en características físicas, tornándose el producto secado de la harinera industrial con un color rojizo. Si bien, no se realizó un costeo del proceso, los resultados se muestran promisorios para una producción competitiva de AF.

**Palabras clave:** maíz, nejayote, lixiviación, solventes supercríticos, ácido ferúlico.

## ABSTRACT

Corn bran is rich in phenolic compounds, constituting approximately 4% of its dry weight. Among the phenolic compounds ferulic acid is the majority (AF). Between 80-95% of the total amount AF, is cross-linked polysaccharides and the rest in conjugated form with mono or oligosaccharides and in free form.

The AF is a major component in plant tissues, is found in wheat bran, whole fruit, citrus, banana, coffee, orange juice, eggplant, bamboo, beets, cabbage, spinach, broccoli, herbal extracts and spices.

Promising data have been reported since 1866, where it was first isolated from a commercial resin and subsequently chemically synthesized in 1925, however, noted its biological effects until 1970; at which Japanese researchers discovered antioxidant properties of rice oil extracted. Promising data from these early studies resulted in a significant increase in the last 10 years on the extraction, identification and quantification, giving a great potential for application in the pharmaceutical industry, cosmetic industry and food industry.

The phenol content was determined by direct hydrolysis of the material under study with organic solvents. The identification and quantity of phenolic compounds extracted are dependent on the extraction technique and the type of solvent used.

Today the extraction of phenolic compounds, provide greater business opportunity, providing economic and environmental stimuli, as it is used as an ingredient in many drugs, functional foods and nutraceuticals from corn.

In order to be competitive and the need to develop more efficient production processes AF, recently working group CIAD Industrial Biotechnology developed a patent, which implements a treatment nejayote (obtained residue tortilla industry ), allowing the AF concentrate through nanofiltration membranes to reverse osmosis.

Therefore, it aims to integrate a process for the recovery of AF from concentrate, to establish the best conditions for spray drying and leaching, using selective solvents. All these tests were carried out at laboratory and pilot plant scale.

It was found that the effect of pH facilitates the drying process, obtaining similar product yields However, at pilot plant AF concentration decreases. As for the physicochemical properties was no negative effect, subjected to a storage period of 120 days at 4 to 25 °C

was observed. 95% AcOEt and the AcOEt: HCl, the solvents were concentrated AF greater selectivity but as compared with SC-CO<sub>2</sub> leaching tends to much higher selectivity, however, the AF performance is very low. While a process costing was performed, the results show promise for competitive production of AF.

**Keywords:** corn, nejayote, leaching, supercritical, ferulic acid.

## I. INTRODUCCIÓN

El ácido ferúlico (AF), es un compuesto fenólico ampliamente encontrado en la pared celular de los vegetales pero su concentración varía de acuerdo a la especie. Se han reportado extracciones de 5 g/Kg de salvado de trigo, 9 g/Kg de pulpa de remolacha y 50 g/kg de cascarilla de maíz (Mattilla y Hellström, 2007).

Durante los últimos 10 años, el interés sobre el ácido ferúlico y otros compuestos fenólicos se ha incrementado enormemente gracias a sus múltiples aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética (Ou y Kwok, 2004; Ou, 2007). Por ejemplo, según la revisión realizada por Fazary y Ju (2007), el número de artículos y patentes relacionados con el ácido ferúlico y enzimas empleadas para su liberación ha tenido un crecimiento exponencial desde el año 2000.

El área que mayor demanda comercial genera por el AF es la de los saborizantes y aromas, donde este compuesto es empleando como un precursor para la producción biotecnológica de la vainillina, el saborizante de mayor uso en el mundo (Asaff *et al.*, 2011). La vainillina obtenida por esta vía puede ser etiquetada como saborizante natural y por ende comercializada en los países europeos donde sus legislaciones se han hecho más rigurosas permitiendo el uso únicamente de saborizantes naturales en el área de alimentos (comunicación personal). Este cambio en las legislaciones viene ocasionando un incremento en la demanda de AF.

Actualmente, el AF se obtiene a nivel industrial por tres métodos: El primero de ellos y el más antiguo se da a partir del  $\gamma$ -orizanol, un subproducto de la industria del aceite del salvado de arroz, según se describe en la patente de Hayashi *et al.* (1994). El segundo método se da a partir de los efluentes líquidos de la industria de la tortilla de

maíz (en la producción del nixtamal), conocidos como nejayote, según se describe en la patente de Asaff *et al.* (2008). El tercero y más reciente, se realiza mediante extracción con solventes de la planta *Ferula asafoetida* y el AF obtenido se oferta a precios más bajos que el obtenido por los dos primeros métodos ([http://www.alibaba.com/product-detail/98-Ferulic-Acid-from-Ferula-Assafoetida\\_60004885209.html](http://www.alibaba.com/product-detail/98-Ferulic-Acid-from-Ferula-Assafoetida_60004885209.html)).

Ante una gran demanda, las tecnologías para la obtención de AF vienen evolucionando rápidamente, sobre todo diversificando las fuentes de extracción, tal como se describió en el párrafo anterior. Dentro una economía globalizada, la competitividad radica en una renovación y mejora constantes y el desarrollo de nuevos métodos productivos, más eficaces y eficientes. En este contexto, el presente trabajo planteó el desarrollo de un nuevo método de obtención de ácido ferúlico a partir de un concentrado líquido de un hidrolizado de maíz proveniente del tratamiento del nejayote según la solicitud de patente de Asaff y Reyes (2013). Para ello se establecieron las condiciones más adecuadas de estabilización de la materia prima a través del secado por aspersion y se buscó y determinó el solvente con mayor capacidad selectiva y de extracción para operaciones de lixiviación o extracción sólido-líquido.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Ácido Ferúlico

#### 2.1.1. Origen

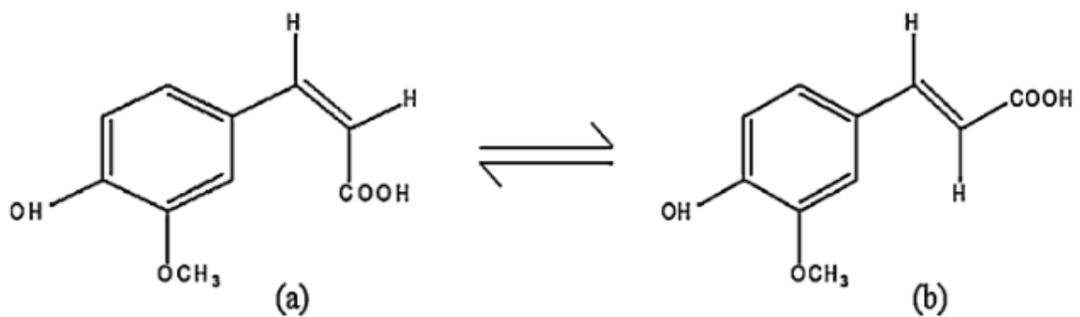
El ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico, conocido usualmente como ácido ferúlico (AF) es un derivado del ácido cinámico, que fue identificado por primera vez en 1886 por Hlasiwetz y Barth a partir de extractos de la planta *Ferula assafoetida*. El AF junto con el ácido dehidroferúlico, son componentes de las lignocelulosas, confiriendo rigidez a la pared celular formando entrecruzamientos con la lignina y polisacáridos de algunas especies vegetales (Izydorczyk y Biliaderis, 1995). Su contenido varía de acuerdo a la especie, habiéndose reportado contenidos de AF de hasta 1.1 mg/100 g de aguacate; 4.6 mg/100 g de rábano; 7.4 mg/100 g de espinaca y 8.7 mg/100 g de maní (Mattilla y Hellstrom, 2007). Sin embargo, el mayor contenido de AF ha sido reportado en los cereales, con 175.9 mg/100 g de maíz, 64.6 mg/100g de trigo, 37.7 mg/100 g de avena y 29.7 mg/100 g de arroz (Adom y Liu, 2002). También se ha reportado un alto contenido de AF en la planta silvestre *Ferula assafoetida* de la que se extrae una resina con un contenido de 60% de ésteres de AF y 1.3% de AF libre (Kajimoto, 1989).

#### 2.1.2. Propiedades Fisicoquímicas

El ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico (C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>) se presenta en dos formas isoméricas, *cis* (de color amarillo, líquido aceitoso) y *trans* (cristalino) (**Figura 1**), siendo la última la más común. La isomerización ocurre durante la extracción ya que es muy sensible a la luz (Faulds y Williamson, 1999). Otras de las características que tiene

el AF es que presenta una fuerte absorbancia a la luz ultravioleta, a longitudes de onda de 248 y 307 nm, en solución acuosa a pH 6; además, también presenta la propiedad fluorescencia. Esta molécula se caracteriza por cristalizar en forma de agujas ortorrómbicas, cuyo punto de fusión es de 174 °C y tiene masa molecular es de 194 g/mol (O'Neil, 2006).

El AF es poco soluble en agua a temperatura ambiente (25 °C), soluble en agua caliente, acetato de etilo, etanol y éter etílico (O'Neil, 2006) y en mezclas de etanol:agua (60%) (Guo *et al.*, 2003).



**Figura 1.** Estructura química del ácido *cis* ferúlico (a) y *trans* ferúlico (b) (Naresh y Vikas, 2014).

### 2.1.3. Aplicaciones

Existen numerosos estudios de las aplicaciones industriales, biomédicas y cosméticas del AF, gracias a su actividad antioxidante, sus propiedades antiinflamatorias, su capacidad de interactuar como inhibidor enzimático o de ciertas interacciones proteicas. Asimismo, el AF es empleado en el área de los alimentos, como precursor de aromas y como un aditivo antioxidante. Recientemente se viene probando en el área de la alimentación animal como un  $\beta$ -agonista o un modulador de la microbiota del rumen. A continuación se presenta un breve resumen de sus principales aplicaciones:

*Área de la salud.* Se ha demostrado que el AF tiene propiedades biológicas importantes para su uso en la prevención o tratamiento de diversas enfermedades. Por

ejemplo, se demostró su efecto hipoglucemiante cuando fue administrado por vía oral en ratones con diabetes inducida. Igualmente se observó la capacidad antioxidante del AF al inhibir la peroxidación de lípidos en tejido adiposo cuando fue suministrado por la misma vía a ratones mutados obesos (KKA<sup>y/a</sup>) (Ohnishi *et al.*, 2004). Este estudio muestra la utilidad del AF para aliviar el estrés oxidativo y atenuar la respuesta hiperglicémica asociada con la diabetes.

Se han reportado también otros efectos fisiológicos beneficiosos ante padecimientos o enfermedades como el Alzheimer (Ono, 2005), cáncer (Chang, 2006), hipertensión (Suzuki, 2007) y aterosclerosis (Wang y Ou-Yang, 2005).

*Área de la cosmética.* Se aplica como componente activo en lociones y bloqueadores solares gracias a su fuerte capacidad de absorción UV, por lo que es un importante agente de protección de la piel (Chan, 2004; Lin, 2005). También se ha sugerido que el AF, al tener una estructura química parecida a la tirosina, inhibe la formación de melanina a través de un mecanismo de inhibición competitiva con la tirosina, por lo que se observa un efecto aclarante en la piel. (Saija *et al.*, 2000).

*Área de la alimentación humana.* El AF se ha utilizado como aditivo alimenticio y como conservador de alimentos en la industria alimenticia japonesa, debido a su capacidad antioxidante y antimicrobiana (Graf, 1992). El AF en su forma de éster con ácidos grasos (gamma orizanol) es también utilizado como suplemento alimenticio en atletas y fisicoculturistas, ya que permite aumentar la masa muscular magra y disminuir el porcentaje de grasa corporal (Adom y Liu, 2002; Nilesh *et al.*, 2009). Sin embargo, una de sus aplicaciones comerciales más importantes es como precursor de la vainillina, el saborizante de mayor consumo mundial y principal constituyente del extracto natural de vainilla (*Vanilla* spp). A partir del año 2000, la empresa francesa Rhodia empezó la venta de vainillina producida biotecnológicamente por transformación de ácido ferúlico extraído de la cascarilla de arroz. Este producto no es competitivo en precio con la vainillina sintética, aunque a diferencia de esta última, puede ser etiquetada como saborizante natural y competir con el extracto natural de vainilla (Asaff *et al.*, 2011).

*Área de la alimentación animal.* Se ha reportado que el AF tiene un efecto promotor del crecimiento animal, ya que posee una estructura química análoga a los compuestos  $\beta$ -agonistas adrenérgicos, en específico a la norepinefrina que tienen como

función de incrementar la acreción de músculo y disminuir la síntesis de grasa (Pringle *et al.*, 1993). Por ejemplo, en un estudio realizado por Sánchez *et al.* (2011), suplementaron 50 ppm de AF a cerdos en confinamiento y observaron una disminución del espesor de la grasa dorsal con respecto al grupo control.

Por otro lado, Peña (2014) evaluó el efecto de la suplementación de AF y etil ferulato en la dieta de ganado bovino observando que la ganancia diaria de peso fue mayor en animales suplementados respecto al control. En este mismo estudio también se demostró que el AF y sobre todo el etil ferulato, tienen un efecto positivo sobre diferentes parámetros que caracterizan a la calidad de la carne de bovinos.

#### **2.1.4. Obtención del Ácido Ferúlico**

Ante este incremento en la demanda del mercado, las fuentes y métodos para la obtención de ácido ferúlico se han ido diversificando, tal como se presenta a continuación:

2.1.4.1. A partir de arroz. Una de las principales fuentes para la producción industrial de AF son los subproductos de la industria del aceite del salvado de arroz, concretamente del  $\gamma$ - orizanol, un éster del AF, según se describe en la patente de Hayashi *et al.* (1994). El proceso comprende la hidrólisis alcalina del  $\gamma$ -orizanol durante 8 h a temperaturas entre 90 y 100 °C. Después, se lleva a cabo la precipitación del AF liberado por enfriamiento de la solución resultante, la recuperación del AF crudo y su posterior purificación por re cristalización. La materia prima de la que parte este proceso ya tiene un valor comercial, razón por la cual el costo de producción del AF mediante este proceso es elevado.

2.1.4.2. A partir de maíz. Otro proceso para la producción industrial de AF se da a partir de los efluentes líquidos de la industria del nixtamal, la masa y la tortilla, conocidos como nejayote y que básicamente es un hidrolizado alcalino del pericarpio del maíz, donde el AF se encuentra en forma libre. El proceso según es descrito en la patente de

Asaff *et al.* (2008), consiste en la adsorción selectiva de los compuestos fenólicos, su desorción mediante etanol, la concentración de la solución resultante por evaporación y una purificación primaria por cristalización.

Si bien en este caso la materia prima es un efluente industrial sin valor económico, el número de pasos del proceso y las operaciones secundarias para la recuperación y purificación de solventes, así como la purificación y secado del producto ocasionan que el costo unitario de producción sea elevado (comunicación personal). Adicionalmente se conoce que la eficiencia de recuperación es superior al 50%.

2.1.4.3. A partir de *ferula asafoetida*. De manera industrial, según datos especificados por la empresa Changsha Winner Bio-Tech Co., Ltd., el AF se extrae a partir de la planta *ferula asafoetida*, en específico de la flor, mediante una serie de operaciones unitarias que comprenden el lavado de la materia prima, secado, trituración, extracción (etanol:H<sub>2</sub>O), concentración, eliminación del solvente, purificación por adsorción, secado y tamizado ([http://www.alibaba.com/product-detail/98-Ferulic-Acid-from-Ferula-Assafoetida\\_60004885209.html](http://www.alibaba.com/product-detail/98-Ferulic-Acid-from-Ferula-Assafoetida_60004885209.html)).

2.1.4.4. A partir de otros residuos vegetales. Aunque no de manera industrial, se ha investigado también el uso de otras fuentes para la obtención de AF. Por ejemplo se investigó el uso del bagazo de cerveza, que es un subproducto agroindustrial resultante del proceso de prensado y filtración del mosto obtenido tras la sacarificación del grano del cereal malteado (generalmente cebada). Dicho producto se sometió a una hidrólisis alcalina para la extracción de AF, obteniendo un licor con 145.3 mg/L de AF, lo cual, corresponde a 9.65 mg AF/g de lignina solubilizada (Mussato *et al.*, 2007).

Por otro lado, se reportó la generación de 0.24 mg AF/g de materia seca después de una hidrólisis alcalina de la pulpa de café, un residuo agroindustrial que es generado en grandes volúmenes (Benoit *et al.*, 2006).

2.1.4.5. Por síntesis química. El AF puede ser preparado por la reacción de condensación de la vainillina con ácido malónico catalizada por la piperidina (Adams y Bockstahler, 1952). Sin embargo, aunque dicha reacción de condensación produce un alto

rendimiento de AF, requiere de prolongados tiempos de proceso (alrededor de tres semanas). Adicionalmente, el AF de síntesis no es una opción comercial para el mercado ya que la demanda se centra en un producto de origen 100% natural.

## 2.2. Concentrado de Hidrolizados Alcalinos de Maíz como Nueva Fuente de Ácido Ferúlico

### 2.2.1. Generalidades

Recientemente, en el grupo de investigación de adscripción, se desarrolló una nueva tecnología para el tratamiento de los efluentes líquidos de la industria del nixtamal, la masa y la tortilla, conocidos usualmente como nejayote (Asaff y Reyes, 2013). Esta tecnología se basa en la eliminación enzimática de los sólidos finos en suspensión y el filtrado del sobrenadante libre de sólidos a través de membranas de ultra y nano filtración, así como de ósmosis inversa. De esta manera se obtienen dos corrientes; el permeado que es básicamente agua que puede ser reusada o dispuesta de forma medioambientalmente segura y la corriente de rechazo que se va recirculando para obtener un concentrado de los sólidos disueltos que componen el nejayote, entre los que se encuentra el ácido ferúlico.

### 2.2.2. El Nejayote como Subproducto del Proceso de Nixtamalización

El proceso de nixtamalización tradicional consiste en cocer los granos de maíz con agua y cal principalmente con el propósito de liberarlos del pericarpio, para luego proceder a su molienda y así obtener la masa con la cual son elaboradas las tortillas, alimento básico en México y otros países de América, cuyo uso se ha venido extendiendo a nivel mundial (<http://www.fao.org/docrep/t0395s/T0395S06.htm>). En una modalidad industrial, los granos cocidos y molidos son secados para obtener una harina de maíz nixtamalizado, que luego de ser rehidratada se utiliza nuevamente para la

preparación de la masa con la que se elabora la tortilla y otros derivados. Usualmente, por cada kilogramo de granos de maíz se emplean dos a tres litros de solución alcalina de hidróxido de calcio (cal) a una concentración aproximada de 1% y se calienta hasta alcanzar una temperatura entre 90-100 °C durante un lapso de 30 a 60 minutos. Después, se corta el suministro de calor y se deja reposar 12-14 horas (Rosentrater, 2006).

El agua de cocción denominada nejayote, se elimina y el maíz cocido ahora denominado nixtamal, se lava dos o tres veces para eliminar el pericarpio remanente y el exceso de cal o alguna otra impureza del grano (Castillo, 2009).

El nejayote tiene altas concentraciones de materia orgánica en suspensión y en solución 20-30 g/L, debido a la lixiviación ocurrida en el proceso de cocción. El material soluble está formado por hidrolizados de los carbohidratos del grano de maíz, sales de calcio y sales de ácidos fenólicos (Rosentrater, 2002; Asaff *et al.*, 2008), mientras que la materia insoluble corresponde a los residuos del tejido del pericarpio del maíz (Rosentrater, 2002). Debido a la utilización de hidróxido de calcio en el proceso el pH está cerca del límite máximo de la alcalinidad (10 a 14). La composición aproximada del nejayote se presenta en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Composición del nejayote

Compuesto	% base seca*
Proteína soluble	4.76-4.90*
Grasa	0.74-5.76*
Carbohidratos	71.93-75.41*
Almidón	2.57-32.0*
Polisacáridos no amiláceos	49.8-79.1*
Fibra cruda	19.29-22.77*
Lignina	0.36-0.67*
Extracto libre de nitrógeno	52.45-55.67*
Proteína	0.81-7.42*
Cenizas	1.09-12.66*
Calcio	4.68-13.13*

Datos tomados y modificados de Rosentrater, (2006) y Velasco, (1997)

En la patente de Asaff *et al.* (2008) se reporta que en el nejayote se encuentran contenidos diversos compuestos fenólicos como los ácidos *trans*-ferúlico, *p*-coumárico, protocatecoico y 8,5'-diferúlico. De estos compuestos el único que se presenta en una concentración importante, entre 1.0 a 2.0 g/L, es el ácido *trans*-ferúlico.

Por otro lado, Rojas-García *et al.* (2012) ha reportado un contenido de AF libre en nejayotes de diferentes genotipos de maíz, cuantificando una concentración de 11.69 mg/g de nejayote liofilizado de maíz blanco y 13.53 mg/g de nejayote de maíz amarillo. También, Gutiérrez-Uribe *et al.* (2010), encontró una concentración de 99.06 y 96.74 mg/100 g MS, en nejayote de maíz blanco y amarillo, respectivamente.

La composición del nejayote tiene rangos de variación amplios ya que se ve afectada por diferentes variables como: tipo de maíz, dureza del endospermo, calidad del grano, tipo y concentración de cal, tiempo y temperatura de cocimiento y remojo, manejo del maíz durante su lavado y transporte, equipo y prácticas de proceso (Rosentrater, 2006).

El nejayote es considerado un desecho altamente contaminante desde el punto de vista ambiental debido a su carga inorgánica y orgánica elevadas que genera demandas bioquímicas de oxígeno de 7,000 a 10,000 mg O<sub>2</sub>/L, cuando las normas ambientales (NOM-001-ECOL-1996 y NOM-002-ECOL-1996) señalan un límite máximo de descarga de 200 mg O<sub>2</sub>/L (Reyes *et al.*, 2013). Basándose en que el uso promedio de agua es de tres veces más por tanto de maíz (3:1), se estima que una tonelada de maíz genera entre 2.8 y 3.3 m<sup>3</sup> de nejayote. Calculando que una planta con una capacidad de 600 ton de maíz/día genera entre 1500 y 2000 m<sup>3</sup> de nejayote. Consecuentemente considerando que el grano de maíz absorbe del 14 al 48% del agua utilizada durante el proceso de la nixtamalización, el volumen estimado de nejayote que se produce en México es de 1.2 millones de m<sup>3</sup>/día (Valderrama-Bravo *et al.*, 2012).

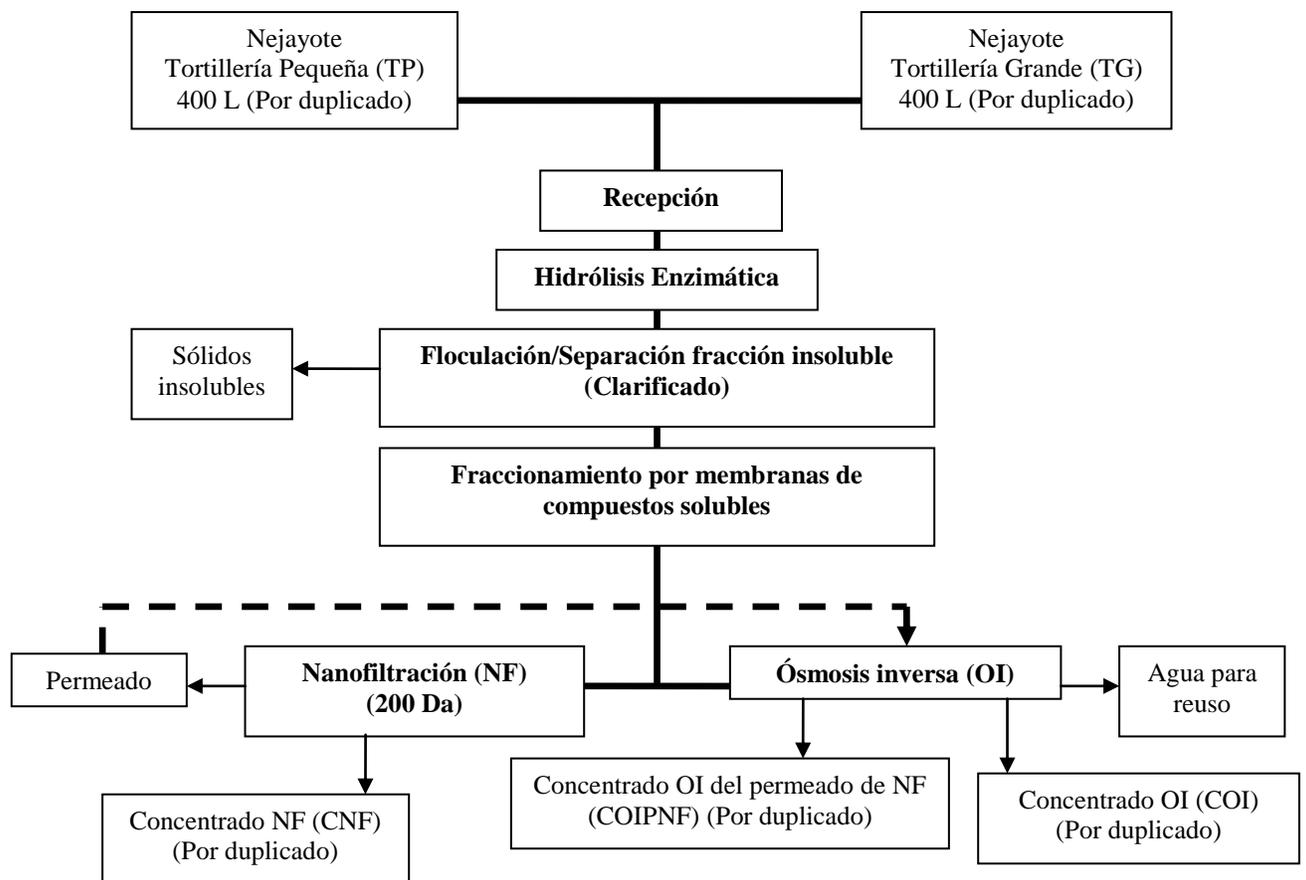
### **2.2.3. Uso de Sistemas de Membranas para el Manejo del Nejayote**

Recientemente, el desarrollo de nuevos materiales ha permitido la diversificación de usos de membranas de ultra filtración, nano filtración y ósmosis inversa para el tratamiento de efluentes industriales corrosivos o incrustantes. Anteriormente, el uso de este tipo de membranas estaba restringido al tratamiento de aguas y algunos procesos biotecnológicos e industriales y su costo era considerablemente mayor al de los precios actuales.

La característica de una membrana de retener la mayoría de las moléculas de tamaño conocido es generalmente usada para especificar la porosidad de ésta. El término comúnmente empleado para caracterizar las membranas es el corte efectivo del peso molecular (MWCO, por sus siglas en inglés), expresado en Dalton (Da). De esta manera, las partículas de mayor peso molecular (PM) al especificado para una membrana, quedarán en el retenido y las de menor PM permanecerán en solución en el permeado (Caballero, 2003). Dentro de los procesos de separación con membranas destacan los que tienen como fuerza impulsora una diferencia de presión. Estos sistemas se pueden agrupar en cuatro categorías dependiendo a las moléculas o partículas que separan: microfiltración (>5000 Da), ultrafiltración (1000-5000 Da), nanofiltración (100-1000 Da) y ósmosis inversa (OI) (<100 Da) (Madare, 1998).

Si bien el nejayote es calificado como un efluente altamente contaminante, puede ser considerado también como una fuente importante de compuestos de alto valor, como el ácido ferúlico y otros compuestos fenólicos, compuestos con valor comercial, como las hemicelulosas y productos con valor estratégico, como el agua para reuso, un bien cada vez más escaso. En este contexto, el grupo de investigación de adscripción, recientemente desarrolló un método y un sistema que comprende el uso de membranas para el manejo integral del nejayote que permite fraccionar o concentrar los componentes contenidos, generando corrientes de productos (permeado) y rechazo (retenido) (Asaff y Reyes, 2013).

En una de sus modalidades, el sistema desarrollado en la solicitud de patente de Asaff y Reyes (2013) permite a través de la recirculación de la corriente de rechazo por membranas de ósmosis inversa o de nanofiltración (200 Da), la generación de una corriente de agua para reuso y un concentrado conteniendo los sólidos solubles del nejayote, entre los que se encuentra el ácido ferúlico. Dependiendo del contenido de sólidos disueltos iniciales, la corriente de rechazo puede ser concentrada entre 4 a 10 veces. Para poder emplear el sistema de membranas, los sólidos en suspensión deben ser previamente eliminados mediante un método de hidrólisis enzimática, seguida de una floculación y separación mediante procedimientos físicos como la sedimentación y/o filtrado. El procedimiento global de la aplicación del método y sistema de membranas para el manejo del nejayote se presentan en la **Figura 2**.



**Figura 2.** Esquema del método y sistema de membranas para el manejo del nejayote.

## 2.3. Desarrollo de un Nuevo Método de Obtención de Ácido Ferúlico a partir del Concentrado de Nejayote

En la **Tabla 1** se muestra que el nejayote contiene una elevada cantidad de carbohidratos, sales y material proteico suficiente para sustentar el crecimiento de hongos y bacterias, por lo que el concentrado obtenido por la tecnología de membranas se hace más susceptible aún a una rápida degradación por la actividad microbiana. Como un primer paso para el desarrollo de un posible método para la extracción del ácido ferúlico contenido en el concentrado es necesario la estabilización del concentrado mediante su secado, aspecto que además de facilitar su conservación mejora también su manejo y almacenamiento al reducir su volumen.

Como siguiente paso en el desarrollo de un nuevo método para la extracción de ácido ferúlico, ahora a partir del material deshidratado obtenido del concentrado de membranas, se propone el uso de solventes selectivos para una extracción líquido-sólido o lixiviación del material de interés.

### 2.3.1. Secado por Aspersión

2.3.1.1. Generalidades. La operación de secado por aspersión consiste en la transformación de un influente en estado líquido a un producto sólido y seco, al poner en contacto dicha alimentación en forma de gotas finas con una corriente de aire caliente. El tiempo de contacto es muy corto y en consecuencia el daño debido al calor también es mínimo. El influente es pulverizado por medio de un atomizador y en forma simultánea entra en contacto con una corriente de aire caliente (medio convectivo); las partículas caen por gravedad y se secan en el trayecto de la cámara de secado donde posteriormente llegan al ciclón (se produce la separación del aire saturado con humedad y el producto seco) y se recolectan en forma de polvo (Palmieri, 2001).

Las ventajas que representa el secar un producto respecto al manejo del material original son (Barbosa y Vega, 2000):

- Se aumenta el tiempo de vida útil del producto.
- Se facilita el manejo del producto.
- Se reduce el espacio de almacenamiento del producto.
- Se reducen los costos de almacenamiento y embarque.

En un estudio realizado por Zalacain (2001), en lo que deduce, que la degradación de los taninos es mucho menor de la que se podría esperar en un principio al utilizar altas temperaturas de atomización. Si se parte de un extracto a 26 °Brix, una temperatura de entrada de 130 °C proporciona un producto de mayor calidad que si se utiliza una temperatura de atomización de 160 °C. Si el extracto está más diluido (21 °Brix) es necesario eliminar mayor cantidad de agua y por lo tanto utilizar temperaturas de atomización más altas, 169-176 °C. La elección de las temperaturas de atomización a nivel industrial dependerá de la relación entre el tiempo de secado y la energía necesaria, puesto que el porcentaje de degradación térmica es mínimo.

2.3.1.2. Parámetros de proceso. Las características de la corriente de alimentación, así como las condiciones de operación son críticas para el secado por aspersión. La viscosidad y concentración de los sólidos disueltos, usualmente medidos como °Brix, son parámetros a ser determinados en el influente ya que afectarán la eficiencia del proceso de secado y las características del producto final. Una viscosidad adecuada de la solución y un contenido elevado de sólidos totales son factores críticos para el rendimiento en el proceso de secado. Una viscosidad baja permite una mejor fluidez de la mezcla en el sistema de atomización (disco o difusor) y una alta concentración de sólidos totales incrementa el rendimiento del producto final (López *et al.*, 2009).

Otras características de diseño de los equipos de secado por aspersión, son el sistema de atomización, la geometría y proporciones de la cámara de secado definen también el tamaño de los gránulos a obtener.

En cuanto a los parámetros de operación, la temperatura de entrada y salida del aire definen el contenido de humedad en el producto final a través de un control indirecto en la proporción de las corrientes de alimentación y de aire para secado. En el caso de productos termolábiles, como el AF, se procurarán establecer condiciones de

operación que minimicen la exposición de las corrientes de alimentación a altas temperaturas.

### **2.3.2. Proceso de Extracción Sólido-Líquido: Lixiviación**

2.3.2.1. Generalidades. La extracción sólido-líquido es una operación cuya finalidad es la separación de uno o más componentes contenidos en una fase sólida, mediante la utilización de una fase líquida o disolvente. El componente o componentes que se transfieren de la fase sólida a la líquida recibe el nombre de soluto, mientras que el sólido insoluble se denomina inerte (Ibarz y Barbosa., 2005). Es un método muy utilizado en la recuperación de polifenoles a partir de residuos sólidos agro-industriales (Li *et al.*, 2006; Chirinos *et al.*, 2007; Durling *et al.*, 2007; Amendola *et al.*, 2010).

2.3.2.2. Parámetros de proceso. *El tamaño de partícula.*- Es una de las características que define la eficacia de extracción. Partículas pequeñas crean una mayor área interfacial entre el sólido y el líquido y una distancia más corta para que el soluto se difunda a través de la partícula y alcance la superficie. Sin embargo, si el tamaño de partícula es demasiado pequeño, se forman conglomerados que impiden la circulación de solvente entre las partículas y dificultan su separación del mismo, provocando que las partículas de sólido sean arrastradas con el solvente (Bonilla *et al.*, 1999).

*Las características del solvente.*- Para la extracción de compuestos fenólicos, los disolventes polares o de mediana polaridad son los más utilizados. Se han empleado acetato de etilo y dietil-eter para la extracción de compuestos fenólicos de bajo peso molecular desde madera de roble (Fernández de Simón *et al.*, 1996). Igualmente se ha reportado que los compuestos polifenólicos extraídos con acetato de etilo a partir de diferentes sustratos naturales presentan una elevada capacidad antioxidante (Marinova y Yanishlieva, 1997). Sin embargo, el etanol y el agua son los disolventes más frecuentemente utilizados por razones de ausencia de toxicidad y abundancia, respectivamente.

Algunos parámetros que se deben considerar en la selección de un disolvente, según describe Hampe (1986) son los siguientes:

Capacidad. Determinada por el valor del coeficiente de reparto. Generalmente, se selecciona los disolventes que pueden cargar elevadas concentraciones de soluto, para reducir la cantidad de disolvente a emplear, el tamaño del equipo e incluso disminuir los costos de su recuperación.

Selectividad. El disolvente debe ser selectivo para el soluto deseado, evitando la co-extracción de impurezas. Así se reduce o elimina la etapa de lavado de la fase extracto.

Solubilidad. El disolvente debe ser insoluble o poco soluble con la fase refinada y debe formar un complejo con el soluto soluble en el diluyente y evitar la formación de terceras fases.

Reversibilidad. Debe ser posible invertir el proceso de extracción para recuperar el disolvente, bien sea por métodos físicos o químicos. Este parámetro es bastante importante desde el punto de vista económico.

Disponibilidad. El disolvente debe estar disponible en cualquier momento y tener más de un proveedor.

Propiedades físicas. Un valor razonablemente elevado de tensión superficial mejora la separación de las fases. Por otro lado, una viscosidad baja proporciona mejor transferencia de materia y buena separación reduciendo, además, la energía requerida para el bombeo de las fases.

Seguridad. Toxicidad e inflamabilidad son parámetros a tener en cuenta.

Costos. El disolvente debe ser lo más barato posible. De todas formas, esto no suele ser crítico ya que algunos de los otros factores puede tener una influencia mucho mayor sobre los costos globales.

*Tiempo de contacto.*- El tiempo de extracción es determinante a la hora de obtener un mayor rendimiento pero ha sido un parámetro mucho menos estudiado. Se han reportado tiempos de extracción desde 1 min a 24 horas (Price *et al.*, 2008; Cork y Krockengerg, 1991), teniendo en cuenta que largos periodos de extracción pueden producir oxidaciones, que se minimizan añadiendo agentes reductores (Khanna *et al.*, 1968).

*Temperatura.* - La temperatura durante la extracción afecta a la estabilidad de los compuestos fenólicos debido a la participación de reacciones de degradación química y enzimática, pérdidas por volatilización o la descomposición térmica.

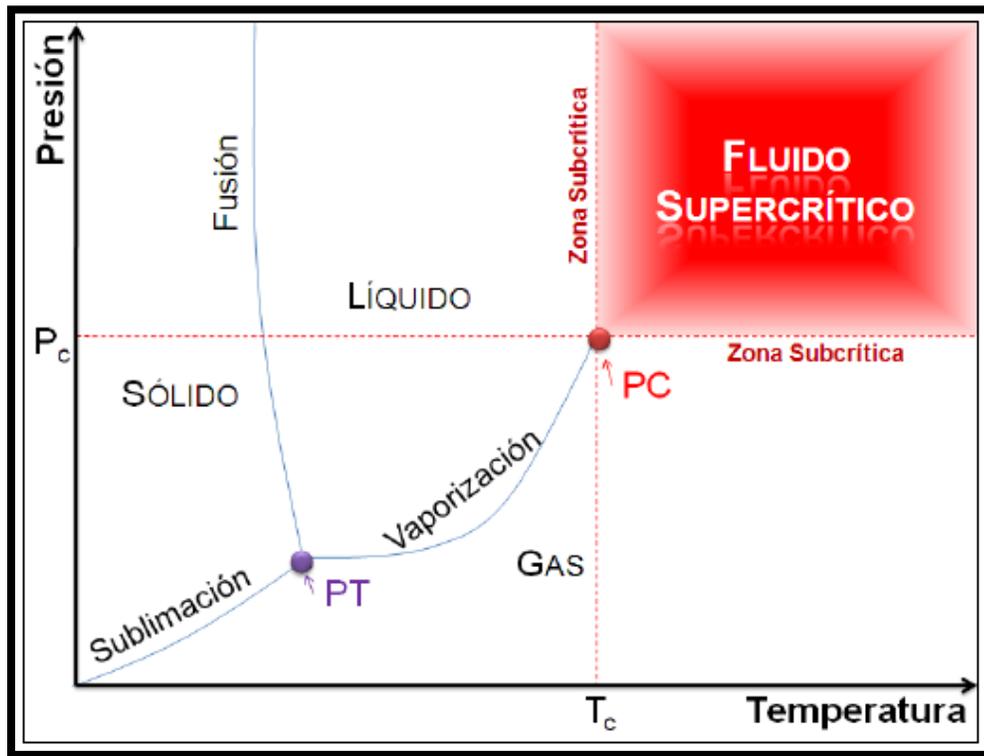
Larrauri *et al.* (1997) encontraron que la temperatura es la variable más influyente sobre la alteración de los polifenoles. Algunos polifenoles aumentan su capacidad antioxidante mediante procesos de pirólisis suaves sobre los compuestos iniciales, especialmente en el caso del ácido cafeico. En procesos de extracción enzimáticos de pulpas de uvas, el uso de temperaturas moderadas a tiempos de operación largos conducen a la degradación de los compuestos fenólicos, mientras que en procesos de hidrólisis de duración entre 1-8 h no se observa degradación de estos compuestos.

2.3.2.3. Extracción con fluidos supercríticos. Los métodos comúnmente usados para la extracción de compuestos antioxidantes en plantas involucran la aplicación de solventes de distinta polaridad, con el inconveniente de manejar grandes volúmenes de solvente, acompañada de un alto costo y del cuestionamiento del uso de los mismos (Menaker, 2004; Cavero, 2006).

Recientemente, ha habido un interés creciente en el uso de la extracción con fluidos supercríticos (EFS), principalmente con dióxido de carbono como solvente. Este proceso usa las propiedades de los gases por sobre sus puntos críticos para extraer en forma selectiva los componentes solubles de una materia prima (Cavero, 2006). Tal como se muestra la **Figura 3**, un fluido supercrítico se define como una sustancia que se encuentra por arriba de la presión crítica ( $P_c$ ) y la temperatura crítica ( $T_c$ ). Por sobre el punto crítico (PC) la sustancia no se puede considerar ni un líquido ni un gas; sin embargo, posee propiedades de ambos: se comporta como un gas al llenar y tomar la forma de su contenedor y tiene la densidad de un líquido, además de su poder disolvente.

El  $\text{CO}_2$  es el solvente frecuentemente usado para la EFS debido a sus ventajas prácticas, las que incluyen su carácter no tóxico, no inflamable, su gran disponibilidad, bajo costo a alta pureza y su conveniencia para extraer compuestos termolábiles y compuestos con baja volatilidad y polaridad. Cuando el extracto se recupera en los separadores, el  $\text{CO}_2$  es fácilmente separado debido a su alta volatilidad (Díaz-Reinoso,

2006). Una limitación que presenta el dióxido de carbono como fluido supercrítico es su carácter apolar, que lo hace un disolvente poco adecuado para compuestos polares. Igualmente otra característica del CO<sub>2</sub> supercrítico es que las sustancias son menos solubles en él a medida que aumenta su peso molecular. Sin embargo, esta característica puede no ser una desventaja, puesto que confiere una mayor selectividad en la extracción de compuestos y más posibilidades en el fraccionamiento de los mismos (Vázquez, 2008).



**Figura 3.** Diagrama de temperatura versus presión de una sustancia para conocer las condiciones de punto triple y punto crítico (Herrero, 2006).

Al igual que todas las sustancias, el CO<sub>2</sub> es susceptible de ser polarizado al variar la densidad mediante la modificación de la presión y/o temperatura dentro de la zona supercrítica (Rizvi, 1994). Igualmente, la adición de pequeñas cantidades de modificadores o co-solventes, que son sustancias polares, pueden variar enormemente la polaridad del fluido si son añadidas en conjunto durante la extracción (Vázquez, 2008). De manera general, estos co-solventes son utilizados en pequeñas cantidades durante el

proceso ya que los cambios en la polaridad se logran desde 5% de co-solvente en el fluido de extracción (Yilmaz *et al.*, 2011). El co-solvente más utilizado es el etanol, debido a que es una sustancia GRAS (Generally recognized as safe, por sus siglas en inglés) aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) para su uso en productos de consumo humano (Herrero *et al.*, 2010; Yilmaz *et al.*, 2011).

### III. JUSTIFICACIÓN

El ácido ferúlico, un constituyente de la pared celular de plantas, resulta comercialmente importante debido a sus aplicaciones en la industria de alimentos, cosmética y farmacológica. Industrialmente es producido a partir de subproductos del aceite de arroz y recientemente a partir de la planta *Ferula assafoetida*, principalmente por los países del sudeste asiático. En México se produce a partir del nejayote, un efluente abundante de la industria de la tortilla. La situación del mercado actual muestran que las fuentes para la obtención de ácido ferúlico se han ido diversificando así como su producción que abaratan el precio de su venta, por lo que se plantea la necesidad de desarrollar procesos más eficientes y por ende, más económicos para la producción de ácido ferúlico con el afán de ser competitivo en el mercado global. Recientemente, el grupo de investigación desarrolló una nueva tecnología que permite obtener un concentrado de hidrolizados alcalinos de maíz, rico en ácido ferúlico, que podría emplearse como materia prima para la producción de este compuesto.

En base a lo anterior puede evaluarse la posibilidad de integrar un proceso eficiente a través de operaciones unitarias como, el secado por aspersion del la nueva fuente en este caso los hidrolizados alcalinos de maíz y la lixiviación del ácido ferúlico a partir del producto deshidratado.

#### **IV. HIPÓTESIS**

El secado por aspersión y la extracción sólido-líquido (lixiviación), pueden ser integradas como operaciones unitarias de un proceso eficiente para la recuperación de ácido ferúlico a partir de un hidrolizado concentrado, resultante del tratamiento por membranas del nejayote.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 General

Integrar un proceso para la recuperación de ácido ferúlico a través del secado por aspersión del hidrolizado obtenido del tratamiento por membranas del nejayote y su lixiviación a partir del producto deshidratado resultante.

### 5.2 Específicos

1. Determinar las características fisicoquímicas del hidrolizado concentrado, catalogado como materia prima.
2. Establecer el efecto de la viabilidad técnica del secado por aspersión para la deshidratación del hidrolizado concentrado obtenido del tratamiento por membranas del nejayote.
3. Evaluar el efecto del proceso de nixtamalización sobre las características del hidrolizado concentrado y la operación de secado.
4. Determinar el efecto del pH sobre las características fisicoquímicas del producto deshidratado.
5. Establecer el efecto de la escala del equipo de secado sobre las características fisicoquímicas del producto deshidratado.
6. Evaluar el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas del producto deshidratado.
7. Seleccionar el solvente que permita obtener una extracción selectiva del ácido ferúlico a partir del producto deshidratado.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Muestreo del Nejayote**

El nejayote fue proporcionado por una pequeña empresa productora de tortillas ubicada en el municipio de Zapopan y una gran empresa productora de harina de maíz nixtamalizado, ubicada en Guadalajara, ambas en el Estado Jalisco. El nejayote en cada una de las empresas fue colectado en envases de 20 y 40 L y transportado a la Planta Piloto del CIATEJ. De cada empresa se realizaron 2 colectas, aproximadamente de 400 L cada una, en días diferentes, como muestras independientes para el análisis estadístico. En algunos casos las muestras fueron almacenadas en una cámara de refrigeración a 4 °C hasta su uso.

### **6.2. Preparación del Nejayote**

El nejayote fue tratado de acuerdo a la solicitud patente de Asaff y Reyes (2013), mediante las siguientes etapas: 1) Neutralización del nejayote con ácido sulfúrico, 2) Hidrólisis enzimática de los gránulos de almidón, 3) Floculación/separación de la fracción insoluble y 4) Microfiltración del sobrenadante por membranas de 1µm.

### **6.3. Preparación del Hidrolizado Concentrado**

Se utilizaron 2 tipos de membranas; una membrana espiral de nanofiltración de poliamida (200 Da MWCO), modelo 3838 SR3D-NYV, Koch Membrane Systems, Inc., 7.1 m<sup>2</sup> de área, operación a 100 psi 30° C y una membrana de ósmosis inversa de

poliamida, modelo 3838 HR-NYV Koch Membrane Systems, Inc., 7.1 m<sup>2</sup> de área, operación a 100 psi 30° C. Se obtuvieron 3 concentrados de acuerdo al tipo de membrana empleado o una combinación de ambas. El concentrado resultante de la membrana de ósmosis inversa (COI), el resultante de la concentración con la membrana de de nanofiltración (CNF) y el resultante de la concentración por membrana de ósmosis inversa del permeado de la membrana de nanofiltración (COIPNF).

Los volúmenes tratados y volúmenes obtenidos en cada prueba se presentan en la **Tabla 2**. Cada concentrado se almacenó en garrafones de 20 L a 4 °C hasta su uso.

Los hidrolizados concentrados obtenidos fueron mezclados a efectos de realizar las pruebas de secado, tanto a nivel piloto, como a nivel laboratorio, debido a los volúmenes mínimos de alimentación del sistema piloto. Antes de llevar a cabo el proceso de secado se tomó una alícuota de 1 L de cada mezcla de concentrados de nejayote por empresa para realizar la caracterización fisicoquímica.

**Tabla 2.** Relación de volúmenes tratados y de los concentrados obtenidos de las diferentes muestras de nejayote, con los tipos de membranas utilizados.

Empresa	Sistema de membrana	Volumen de muestra tratada	Volumen de muestra sin sólidos insolubles	Volumen de concentrado de nejayote recuperado	Volumen de concentrado de nejayote para secar
		Litros (L)			
Tortillería Pequeña	COI	100	90	20	<b>47</b>
		100	80	18	
	CNF	100	90	20	<b>42</b>
		100	90	16	
	COIPNF	70	70	7	
		80	80	8	
Harinera Industrial	COI	100	85	20	<b>35</b>
		100	80	16	
	CNF	100	90	12	<b>38</b>
		100	95	15	
	COIPNF	90	90	10	
		70	70	6	

## 6.4. Análisis Fisicoquímicos

### 6.4.1. Sólidos Solubles Totales

Se utilizó la metodología gravimétrica descrita por la AOAC, 986.25, (2000). Se agregó 1 mL de la mezcla de concentrados de nejayote en charolas de aluminio, previamente pesadas y se puso a secar en una estufa a 60 °C por 24 horas. Después se enfrió en un desecador y se pesó. El contenido de sólidos solubles se determinó por diferencia de peso y su concentración se expresó en g/L. Cada muestra se procesó por triplicado.

### 6.4.2. Cenizas

Se realizó mediante la metodología gravimétrica descrita por la AOAC, 942.05, (2000). Se agregó 1 mL de la mezcla de concentrados de nejayote o 1 gr de concentrado de nejayote deshidratado en crisoles previamente secados hasta peso contante, luego se pre-incineraron en una placa de calentamiento hasta que dejaran de desprender humo, enseguida se colocaron en una mufla a 550 °C durante 24 h. Después se enfrió en un desecador y se pesó. El contenido de cenizas se determinó por diferencia de peso y su contenido se expresó en g/L, en el caso de muestras líquidas o en g/100 g muestra seca (MS), en el caso de sólidos. Cada muestra se procesó por triplicado.

### 6.4.3. Material Total Extraíble por Solventes

Se determinó gravimétricamente. Se utilizó una alícuota de 2 mL del material extraído de la cual fue centrifugada a 10000 rpm por 5 min a 24 °C (centrifuga Thermo Scientific, modelo SL16R, USA). Luego una alícuota de 1 mL de los sobrenadantes de extracción, libres de sólidos en suspensión, fue transferida a otro tubo Eppendorf de 2 mL previamente pesado, se llevó a una estufa a 50 °C durante 24 h o hasta la completa

evaporación del solvente. Posteriormente se enfrió en un desecador y se pesó. Cada muestra se procesó por triplicado.

El material extraíble (expresado en g material extraíble/100 g MS) fue estimado según la siguiente ecuación:

$$\text{g material extraíble/100 g MS} = \frac{PTES-PTS}{M} \times 1000$$

donde PTES es el peso en gramos del tubo con el extracto seco, PTS es el peso en gramos del tubo seco, M es el volumen en mL de la muestra inicial.

#### **6.4.4. Azúcares Reductores**

Se determinaron de acuerdo con el método de Miller (1959) con algunas modificaciones. Se preparó el reactivo ácido 3,5 Dinitrosalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich®, St Louis Missouri, USA) pesando 0.1 g en un vial de vidrio de 20 mL forrado con aluminio para protegerlo de la luz y se le agregó 4 mL de agua y se puso en agitación con magneto durante 30 min. Por otro lado, en un vaso de precipitado de 20 mL previamente tarado se pesó 0.16 g de NaOH y 3 g de tartrato sódico potásico agregándole 4 mL de agua y se sonicaron (sonicador Brason, modelo 2510, USA) hasta su completa disolución, luego esta disolución se agregó a la del DNS haciendo un lavado del vaso de precipitado con 2 mL de agua y se dejó agitando por 30 min y al final se mantuvo en refrigeración hasta su uso. Para la lectura de las muestras, en tubos de ensayo de 15x10 con taparrosca se mezclaron, con ayuda de un vortex, 100 µL de muestra con 100 µL de la solución DNS y en seguida se puso en baño maría a 100 °C por 5 min. Terminado el tiempo de reacción, los tubos se enfriaron en hielo, se agregó 1 mL de agua y se dejó reposar por 15 min. Al final se leyó la absorbancia de la solución reaccionante a 540 nm, con un espectrofotómetro (Jenway, modelo 7315, USA), utilizando agua como blanco. Se utilizó una curva patrón de glucosa (0.1, 0.3, 0.6, 1.2, 1.6 y 2 g/L). Los resultados se expresaron como g equivalentes de glucosa (g glucosa/100 g de MS). Los valores se representan como la media de los análisis realizados por triplicado ± error estándar.

#### **6.4.5. Fenoles Totales**

Se determinó mediante el método de Singleton y Rossy (1965) con algunas modificaciones. Primeramente se preparó una disolución de carbonato de sodio al 20% y luego se realizó una disolución del reactivo Folin-Ciocalteu (F-C) (Sigma-Aldrich®, St Louis Missouri, USA) hasta alcanzar una concentración 1N; la disolución se protegió de la luz y se colocó en refrigeración hasta su uso.

Se preparó una solución estándar de 25 g/L de ácido gálico (Sigma-Aldrich®, St Louis Missouri, USA) a partir de la cual se prepararon soluciones de diferente concentración (1, 2, 3, 4 y 5 g/L) para la preparación de la curva de calibración. Esto se realizó tomando respectivamente 20, 40, 60, 80 y 100 µL de la dilución patrón de AF de 0.1 g/L en viales ámbar de 2 mL, luego se adicionó a cada tubo, 250 µL de reactivo F-C 1N y se sonó (Brason, modelo 2510, USA) durante 5 min. Posteriormente, se adicionaron 1250 µL de la disolución de carbonato de sodio al 20% a cada tubo, se llevó a un volumen de 2 mL con agua Milli-Q y se dejó reposar por 2 h a temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ ) y en la oscuridad. También se preparó un blanco con todos los componentes excepto la disolución de ácido gálico. Las muestras fueron medidas a una absorbancia de 760 nm, con un espectrofotómetro de UV (Jenway, modelo 7315, USA). De la misma manera se hizo con cada uno de los extractos, agregando 250 µL y siguiendo la metodología anteriormente descrita. Se verificó la linealidad y reproducibilidad de la curva de calibración. Los resultados se expresaron como g equivalentes de ácido gálico (g ácido gálico/100 g de MS); los valores se representan como la media de los análisis realizados por triplicado  $\pm$  error estándar.

#### **6.4.6. Cuantificación de Ácido Ferúlico por Cromatografía de Convergencia de Ultra Desempeño (UPC<sup>2</sup>)**

Se empleó un cromatógrafo Waters Acquity®, modelo UPC<sup>2</sup>, USA, acoplado a un detector de arreglo de diodos 190-800 nm, realizando la cuantificación a 274 nm. Se utilizó una columna C18 (Waters Acquity®, modelo BEH, USA) de 3x100 mm,

mantenida a 37 °C, usando como fase móvil CO<sub>2</sub> (en estado supercrítico: 1500-2000 psi y temperatura de 31 °C) y metanol con 1% de ácido fórmico, como co-solvente, en una proporción 85:15 (v/v); a una velocidad de flujo de 0.8 mL/min, un volumen de inyección de 2 µl y tiempo de corrida de 8 min. La temperatura del automuestreador se mantuvo a 7 °C para preservar la integridad de los compuestos contenidos en los extractos. Todas las muestras fueron diluidas (1:100) y posteriormente se filtraron a través de una membrana de 0.22 µm. La concentración de AF se cuantificó en g/L y se hicieron los cálculos necesarios para expresarla en g de AF/100 g MS. Los valores se representan como la media de los análisis realizados por triplicado ± error estándar.

## 6.5. Secado por Aspersión

### 6.5.1. Secador de Laboratorio

Se utilizó un equipo de laboratorio marca Yamato (USA), modelo ADL311S, en el cual, se probaron condiciones estándar, con una velocidad máxima de alimentación de aproximadamente 10 mL/min y con temperaturas de aire de entrada y de salida de 125 y 60 °C, respectivamente. El material deshidratado resultante (polvo) fue almacenado en bolsas con cierre hermético de polietileno de alta densidad a temperatura ambiente (25 °C) y a 4 °C para usos y análisis posteriores (contenido: humedad, cenizas, azúcares reductores, fenoles totales y AF).

De cada empresa se cuantificó el rendimiento de producto deshidratado. Los valores se representan como el promedio de dos repeticiones.

En algunas pruebas se hizo un ajuste del pH (3, 4, 5 y 6) para evaluar su efecto en el proceso de secado y en los estudios de lixiviación posteriores. El ajuste se realizó mediante la adición de una solución de ácido sulfúrico o de NaOH, dependiendo del pH inicial del medio y el pH final buscado.

### **6.5.2. Secador de Piloto**

Se utilizó un equipo de fabricación local, fijando como parámetros de operación, temperaturas de aire de entrada y salida de 135 y 80 °C, respectivamente y con una velocidad de alimentación de aproximadamente 10 L/h.

Los hidrolizados concentrados obtenidos fueron mezclados a efectos de realizar las pruebas de secado, debido a los volúmenes mínimos necesarios para la alimentación del sistema piloto. Se ajustó el pH de la mezcla de los concentrados a 4, con ácido sulfúrico. Los polvos resultantes de cada empresa fueron almacenados en frascos de polietileno de alta densidad a temperatura ambiente (25 °C) y a 4 °C para usos y análisis posteriores (contenido: humedad, cenizas, azúcares reductores, fenoles totales y AF). De cada empresa se cuantificó el rendimiento de producto deshidratado. Los valores se representan como el promedio de dos repeticiones.

## **6.6. Extracción Líquido-Sólido o Lixiviación del Ácido Ferúlico**

### **6.6.1. Materia Prima**

Para obtener una cantidad suficiente y homogénea del material de trabajo se mezclaron los diferentes concentrados de nejayote deshidratados que fueron secados a nivel piloto. Se tomaron alícuotas de 250 g de las 4 muestras procesadas (2 por empresa). La mezcla resultante fue caracterizada fisicoquímicamente y se empleó para los estudios de lixiviación.

### **6.6.2. Con Solventes Convencionales**

Los disolventes que fueron utilizados para la lixiviación de AF fueron: etanol 96% (v/v) (EtOH), etanol 77% (v/v) (EtOH 77%); Etanol:HCl (99:1 v/v); acetato de etilo (AcOEt); AcOEt:HCL (99:1 v/v); AcOEt:agua (95:5 v/v) (AcOEt 95%) y *n*-

butanol. Se pesaron 0.5 g de la muestra deshidratada en una balanza analítica (Ohaus Explore® Pro, modelo RS232, USA) y se colocaron en viales de centelleo de 20 mL. Se añadieron 5 mL del solvente correspondiente y se agitaron por 1 min en vórtex (Genie 2, modelo G-560, USA) y después con agitación magnética utilizando un agitador (IKA®, modelo RCTBS1S, USA) a 1500 rpm por 30 min a temperatura ambiente. Enseguida se vertieron en tubos Falcón de 15 mL y se sometieron a centrifugación (Thermo Scientific, modelo SL16R, USA) a 24 °C, 10000 rpm por 5 min; al final se recuperó el sobrenadante. Los sólidos insolubles depositados en los tubos se volvieron a extraer, agregándole la misma cantidad de solvente que la inicial. Al finalizar las extracciones, los sobrenadantes se transfirieron a un vial de vidrio y se almacenaron en refrigeración a 4 °C hasta su uso. A cada uno de los diferentes extractos se les determinó concentración de AF por UPC<sup>2</sup> y materia total extraíble (g/100 g MS) y en base a estos cálculos se determinaron los porcentajes, tanto de rendimiento y selectividad. Los valores se representan como la media de los análisis realizados por triplicado y con 2 repeticiones ± error estándar.

### 6.6.3. Con CO<sub>2</sub> en Estado Supercrítico

Se empleó un equipo escala piloto marca Waters Acquity®, modelo SFC500, USA, compuesto de una celda de extracción alimentada con CO<sub>2</sub> supercrítico, una chaqueta de calentamiento, y un recipiente de separación en el que se deposita el material extraído. En la celda de extracción se depositaron 100 g de muestra deshidratada con un tiempo de extracción de 3 horas. Al finalizar la corrida se recolectaron los sólidos del recipiente de extracción, agregando etanol suficiente para su completa solución y se concentró hasta alcanzar un volumen final de 15 mL en un rotavapor (Yamato, modelo RE301, Suiza) a 55 °C. Los concentrados se transfirieron a viales de vidrio y se almacenaron en refrigeración hasta su uso.

Para la evaluación del efecto de diversas factores sobre el proceso, se realizó un diseño experimental 2<sup>3</sup> tomando como variables independientes presión, temperatura y porcentaje de co-solvente (etanol) (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Matriz de diseño para estudiar la extracción con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico.

# Tratamiento	Variable		
	Temperatura (T, °C)	Presión (P, Bar)	Porcentaje de co-solvente (Co-S, %)
1	50	200	0
2	50	200	10
3	45	150	5
4	45	150	10
5	45	250	5
6	55	150	5
7	55	250	5
8	50	200	5

A cada uno de los diferentes extractos se les determinó concentración de AF por UPC<sup>2</sup> y materia total extraíble (g/100 g MS) y en base a estos cálculos se determinaron los porcentajes, tanto de rendimiento y selectividad. Los valores se representan como la media de los análisis realizados por triplicado y con 2 repeticiones  $\pm$  error estándar.

#### 6.6.4. Análisis Estadístico

Los datos experimentales fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un nivel de significancia de  $p < 0.05$  y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey-Kramer ( $\alpha = 0.05$ ) como diferencia significativa. El análisis se realizó con el programa estadístico NCSS versión 7.0 (Number Cruncher Statistical System for Window, Kaysville, Utah, USA).

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Etapa 1: Caracterización Físicoquímica de la Mezcla de los Hidrolizados Concentrados de Nejayote Obtenidos por Membranas de Diferente Corte.

#### 7.1.1. Parámetros Físicoquímicos

Las industrias de harina de maíz nixtamalizado, nixtamal y tortilla, producen aguas de desecho conocidas como nejayote, que contienen altas concentraciones de materia orgánica, soluble e insoluble, en concentraciones de 20-30 g/L (Rosentrater, 2004); además de material inorgánico en solución. Las condiciones alcalinas de cocción del maíz, provocan el desprendimiento del pericarpio, la hidrólisis parcial de la celulosa, hemicelulosa y la gelatinización del almidón, lo que conlleva a que en el nejayote se encuentren oligosacáridos parcialmente solubles, junto a algunos compuestos fenólicos (Serna-Saldivar *et al.*, 1990).

La **Tabla 4** muestra la composición físicoquímica de la mezcla de los hidrolizados concentrados obtenidos, considerando tanto la procedencia del nejayote.

**Tabla 4.** Características físicoquímicas del concentrado de nejayote líquido por empresas después del tratamiento por los sistemas de membranas.

Parámetro	Tortillería Pequeña	Harinera Industrial
	Contenido (g/L)	
Sólidos solubles totales	55.22 ± 0.67 <sup>a</sup>	65.50 ± 0.60 <sup>b</sup>
Cenizas	12.90 ± 0.11 <sup>a</sup>	20.70 ± 1.26 <sup>b</sup>
Azúcares reductores	3.66 ± 0.39 <sup>a</sup>	6.99 ± 0.016 <sup>b</sup>
Fenoles totales	1.46 ± 0.052 <sup>a</sup>	1.74 ± 0.24 <sup>b</sup>
Ácido ferúlico	0.74 ± 0.063 <sup>a</sup>	0.81 ± 0.20 <sup>b</sup>

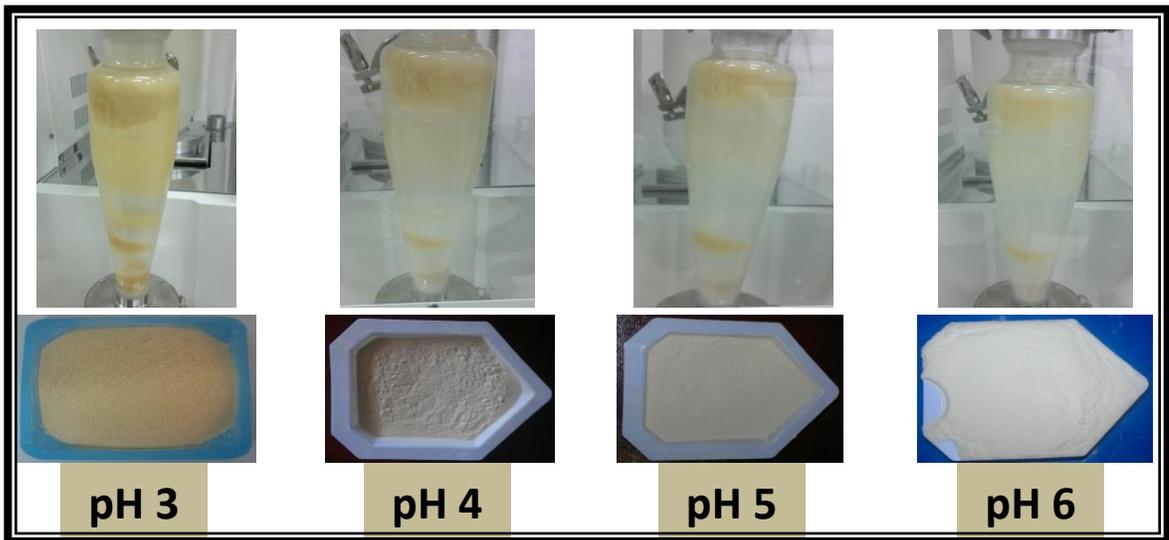
Los valores son las medias de tres determinaciones ± error estándar. Las letras en superíndice diferentes en la misma fila, indican diferencias estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre empresas.

Se observa diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en todos parámetros analizados, presentando mayores contenidos, la harinera industrial que en la tortillería pequeña, como por ejemplo, más sólidos solubles y cenizas que casi duplican en cantidad. Igualmente la cantidad de azúcares reductores presente en el concentrado proveniente de la harinera industrial es el doble que la observada en el concentrado proveniente de la tortillería. Aunque menos drástica, la cantidad de fenoles totales y de ácido ferúlico igualmente es mayor en el concentrado de la harinera industrial. De acuerdo a estos resultados se considera que el nejayote de la harinera industrial está más concentrada, eso quiere decir que la relación maíz/agua posiblemente sea más baja en la harinera que en la tortillería pequeña. Igualmente, un mayor contenido de cenizas indica que la cantidad de cal empleada durante el proceso de nixtamalización realizado en la harinera industrial, también es mayor, provocando posiblemente un mayor grado de hidrólisis al observarse una mayor cantidad de ácido ferúlico libre y de azúcares reductores. Según la revisión realizada por Rosentrater (2006), la composición del nejayote presenta gran variabilidad, debido a que las condiciones de nixtamalización varían de acuerdo al productor.

## 7.2. Etapa 2: Estabilización del Hidrolizado Concentrado a través del Secado por Aspersión.

### **7.2.1. Efecto del pH sobre las Características Físicoquímicas del Producto Deshidratado.**

En la **Figura 4** se presentan las diferencias en color y adhesividad de los gránulos observadas en el producto deshidratado debido al pH de los concentrados alimentados al secador.



**Figura 4.** Aspecto de los deshidratados obtenidos, previo ajuste de pH a diferentes niveles de los hidrolizados concentrados. El proceso de secado se realizó a temperatura del aire de entrada y salida de 125 y 60 °C, respectivamente.

Primero se resaltan las diferencias en color de las muestras obtenidas, partiendo del pardo amarillento a pH 3 y que fue aclarando a medida que el pH fue incrementando, hasta alcanzar un color blanco a pH 6. Otra característica que fue claramente visible fue la adhesividad de los gránulos obtenidos. A pH 3 se obtuvieron polvos altamente pegajosos que quedaron depositados, en su mayor parte, en las paredes de la cámara de secado y que incluso ocasionaron taponamientos de la boquilla de aspersion. A partir de pH 4 se obtuvieron polvos menos pegajosos que pudieron ser recuperados correctamente en el ciclón de producto. La necesidad de evaluar el efecto del pH en el secado es que este parámetro afecta el nivel de agregación molecular del ácido ferúlico al ser una molécula ácida que presenta dos valores de pK (4.0 y 9.0) (Christine *et al.*, 1995). El nivel de agregación cambia la afinidad con diferentes tipos de solventes, aspecto fundamental en procesos de extracción sólido-líquido o lixiviación.

### 7.2.2. Efecto de la Escala de Secado sobre el Rendimiento y las Características Fisicoquímicas del Producto Deshidratado

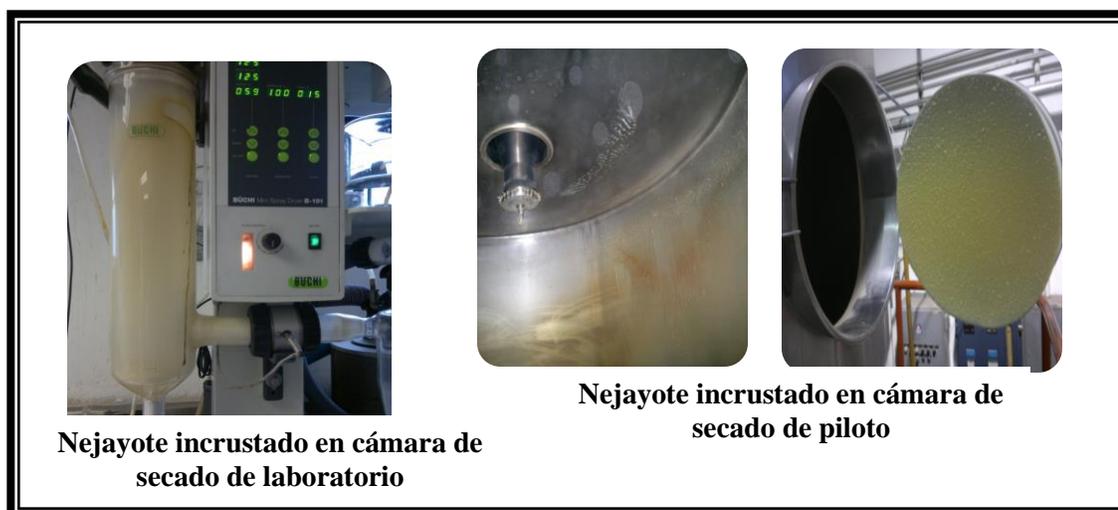
En la **Tabla 5** se presentan los rendimientos de concentrados deshidratados por los equipos de secado de laboratorio y de planta piloto.

**Tabla 5.** Comparación del rendimiento de concentrado de nejayote deshidratado entre el proceso de secado por aspersión a tipo de escala, laboratorio y piloto.

Empresa	Volumen de concentrado (L)	Contenido de sólidos solubles (g/L)	Rendimiento de producto deshidratado	
			Piloto (g)	Laboratorio (g)
Tortillería 1	44	56.35	1336 (53.9%)	1583 (63.8%)
Tortillería 2	42	54.10	1312 (57.7%)	1675 (73.7%)
<b>Promedio</b>		<b>55.22</b>	<b>1324<sup>a</sup> (55.8%)</b>	<b>1631<sup>b</sup> (68.6%)</b>
H. Industrial 1	42	68.35	1049 (36.5%)	1832 (63.8%)
H. Industrial 2	37	62.62	1144 (49.4%)	1848 (79.7%)
<b>Promedio</b>		<b>65.43</b>	<b>1201<sup>a</sup> (42.7%)</b>	<b>1843<sup>b</sup> (65.4%)</b>

Valores con letras en superíndice diferentes en la misma fila, indican diferencias estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre tipo de escala. (Los números entre paréntesis corresponden al rendimiento de recuperación).

Existen diferencias estadísticas en los rendimientos de acuerdo a la escala del equipo utilizado. En el equipo piloto el rendimiento de recuperación fue menor que en el equipo de laboratorio, principalmente debido a que gran parte del producto no pudo ser recuperado de la cámara de secado al encontrarse adherido a la misma, tal como se observa en la **Figura 5**. También se obtuvo un menor rendimiento con los concentrados provenientes de la harinera industrial, posiblemente debido a su mayor contenido de azúcares reductores que pudieron caramelizar. Es probable que el porcentaje de recuperación cambie drásticamente cuando se deshidraten volúmenes mayores en los que el producto adherido sea despreciable en relación al producto recuperado.



**Figura 5.** Cámaras de secado de los equipos utilizados mostrando la presencia de producto adherido a sus paredes.

Por otro lado, no se tienen reportes sobre el secado por aspersión u otro tipo de nejayote para poder realizar comparaciones de rendimientos o efectos sobre alguno de sus constituyentes.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la escala de secado sobre los parámetros fisicoquímicos de los productos resultantes. Los resultados se muestran en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Parámetros fisicoquímicos de los productos deshidratados obtenidos mediante equipos de diferente escala a partir de concentrados provenientes de nejayote de diferentes fuentes.

Empresa	Tortillería pequeña		Harinera industrial	
	Laboratorio	Piloto	Laboratorio	Piloto
<b>Escala de secado</b>				
<b>Parámetro</b>	<b>Contenido (g/100 g MS)</b>			
<b>Humedad</b>	2.22 ± 0.37 <sup>a/A</sup>	1.74 ± 0.26 <sup>a/A</sup>	2.45 ± 0.39 <sup>a/B</sup>	1.97 ± 0.41 <sup>a/B</sup>
<b>Cenizas</b>	18.44 ± 0.07 <sup>a/A</sup>	18.15 ± 0.29 <sup>a/A</sup>	20.96 ± 0.05 <sup>a/B</sup>	22.24 ± 1.04 <sup>a/B</sup>
<b>Azúcares reductores</b>	9.77 ± 0.27 <sup>a/A</sup>	8.28 ± 0.89 <sup>a/A</sup>	20.68 ± 0.89 <sup>a/B</sup>	20.08 ± 0.19 <sup>a/B</sup>
<b>Fenoles totales</b>	3.86 ± 0.08 <sup>a/A</sup>	3.49 ± 0.26 <sup>b/A</sup>	4.14 ± 0.04 <sup>a/B</sup>	3.24 ± 0.59 <sup>b/B</sup>
<b>Ácido ferúlico</b>	3.40 ± 0.07 <sup>a/A</sup>	2.75 ± 0.58 <sup>b/A</sup>	3.16 ± 0.90 <sup>a/B</sup>	2.85 ± 0.95 <sup>b/A</sup>

Los valores son las medias de tres determinaciones ± error estándar. Los valores con letras diferentes en superíndice minúsculas o mayúsculas, indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre el parámetro y tipo de escala de secado; parámetro y empresa, respectivamente.

Se observó que en los parámetros de humedad, cenizas y azúcares reductores, la escala de secado no tuvo efecto alguno. Sin embargo, tanto en los fenoles totales, como el contenido de ácido ferúlico, se vieron afectados sin importar la procedencia del material. Los valores de ambos parámetros resultaron significativamente menores cuando se empleó un equipo de secado piloto en relación a los obtenidos con un secador de laboratorio. Este hecho se atribuye a que durante la operación de secado con el equipo piloto se observó una mayor fluctuación de la temperatura del aire de entrada que alcanzó valores de hasta 135 °C, mientras que en el equipo de laboratorio la temperatura se mantuvo estable a 125 °C. Es conocido que los compuestos fenólicos son termolábiles y que a temperaturas de 55 °C o mayores estos empiezan a degradarse y a perder su funcionalidad (Yilmaz *et al.*, 2011).

En relación al origen del nejayote empleado para la preparación de los concentrados que fueron deshidratados, se observó que en general, los diferentes parámetros fueron mayores en los deshidratados obtenidos de nejayote proveniente de una harinera industrial, mostrando una mayor concentración de los sólidos disueltos, posiblemente porque la relación agua:grano empleada durante la nixtamalización fue menor que en el caso de la tortillería. En el caso de los azúcares reductores, incluso se aprecia que los valores de los deshidratados provenientes de nejayote de la harinera industrial, duplican a los de los deshidratados provenientes de la tortillería, indicando un mayor grado de hidrólisis que pudiera correlacionarse con una nixtamalización con mayor concentración de cal (mayor contenido de cenizas). Por otro lado, el porcentaje de AF en relación a los fenoles totales en el caso de los deshidratados provenientes de nejayote de la tortillería es de aproximadamente 88% mientras que en el caso de la harinera industrial del 75%. Este aspecto también indica que el grado de hidrólisis de los compuestos de naturaleza fenólica también es diferente ya que el AF libre proviene de la hidrólisis de la pared celular donde se encuentra unido a azúcares y otros compuestos fenólicos (Agger, 2011). La diferencia en las proporciones puede ser altamente relevante para los procesos de purificación en los que el AF deberá ser separado de otros contaminantes, usualmente compuestos de la misma naturaleza. Rosentrater (2006), señala que las características y composición del nejayote dependen de varios parámetros,

principalmente del proceso, hecho que permite inferir que las condiciones de nixtamalización que se emplean en la tortillería y en la harinera industrial son diferentes.

### 7.2.3. Efecto de la Temperatura de Almacenamiento sobre las Características Físicoquímicas del Producto Deshidratado

En la **Tabla 7** se muestra la caracterización de los concentrados de nejayote secados por aspersión a nivel piloto y que fueron almacenados a temperatura ambiente y en refrigeración. En general, se aprecia que en todos los parámetros estudiados no hubieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Principalmente destaca la estabilidad del ácido ferúlico a temperatura ambiente al no observarse diferencias significativas con el contenido en el producto almacenado a 4 °C.

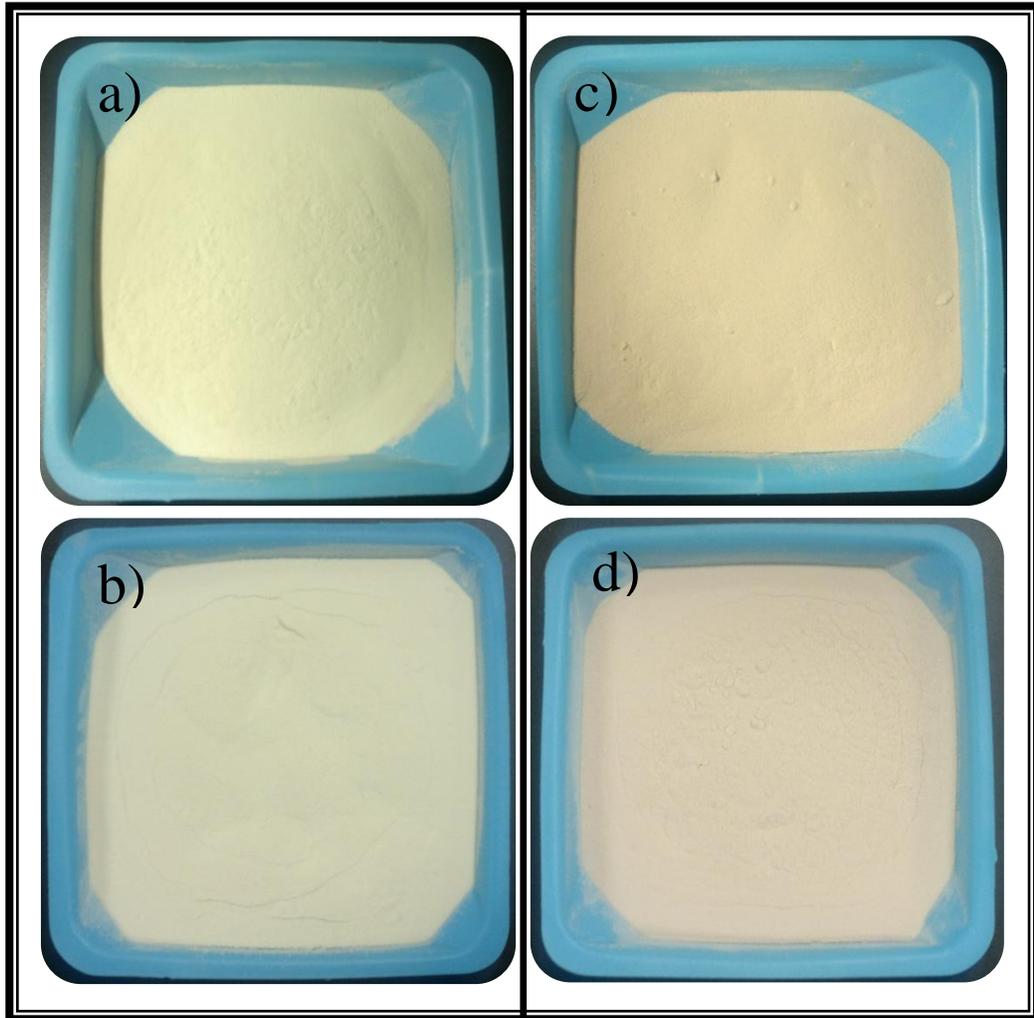
**Tabla 7.** Caracterización físicoquímica de los productos de concentrados de nejayote deshidratados almacenados durante 4 meses a 25 y 4 °C.

Parámetro	Tortillería Pequeña		Harinera Industrial	
	Temperatura de almacenamiento			
	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C
	Contenido (g/100 g MS)			
Humedad	2.82 ± 0.77 <sup>a</sup>	2.74 ± 0.56 <sup>a</sup>	2.95 ± 0.89 <sup>a</sup>	2.37 ± 0.31 <sup>a</sup>
Cenizas	18.94 ± 0.17 <sup>a</sup>	18.65 ± 0.19 <sup>a</sup>	20.66 ± 0.39 <sup>a</sup>	22.04 ± 0.34 <sup>a</sup>
Azúcares reductores	8.78 ± 0.89 <sup>a</sup>	9.97 ± 0.89 <sup>a</sup>	20.12 ± 0.19 <sup>a</sup>	20.96 ± 0.33 <sup>a</sup>
Fenoles totales	3.49 ± 0.26 <sup>a</sup>	3.48 ± 0.08 <sup>a</sup>	3.84 ± 0.041 <sup>a</sup>	3.81 ± 0.45 <sup>a</sup>
Ácido ferúlico	3.04 ± 0.58 <sup>a</sup>	2.97 ± 0.81 <sup>a</sup>	2.85 ± 0.95 <sup>a</sup>	2.68 ± 0.90 <sup>a</sup>

Los datos expresados son las medias de 3 repeticiones ± error estándar. Las letras en superíndice diferentes en la misma fila, indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Sin embargo, los productos almacenados a 4 °C mantuvieron su coloración blanquecina inicial mientras que los productos almacenados a temperatura ambiente cambiaron a una tonalidad rojiza, en el caso del producto proveniente de la harinera

industrial y tenuemente a una tonalidad crema, en el caso del producto proveniente de la tortillería (**Figura 6**). El cambio de color probablemente esté relacionado con la degradación de algún otro componente no cuantificado y de mayor labilidad que el ácido ferúlico.



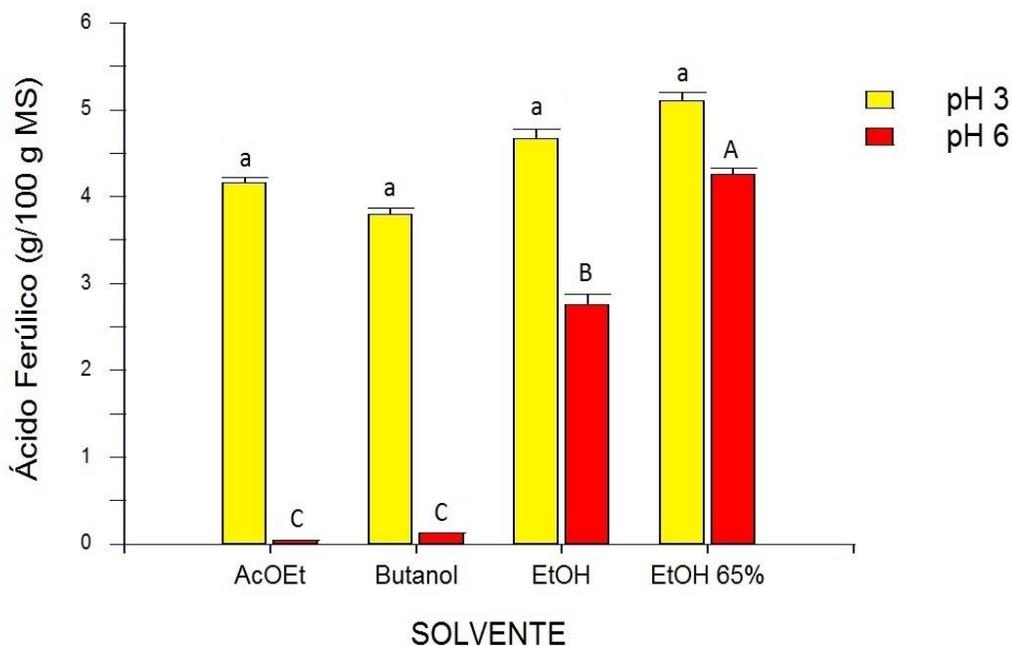
**Figura 6.** Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el color de los productos deshidratados. Productos provenientes de: a) Tortillería almacenado a 4 °C; b) Tortillería almacenado a 25 °C; c) Harinera industrial almacenado a 4 °C y d) Harinera industrial almacenado a 25 °C.

Aunque se observa que algún(os) componente(s) del producto deshidratado puede(n) sufrir alguna modificación química al cabo de 4 meses de almacenamiento a temperatura ambiente, el compuesto de interés (ácido ferúlico) permanece estable, con lo que se demuestra que el secado y la técnica elegida para el efecto lograron plenamente el objetivo de estabilización del concentrado.

### 7.3. Etapa 3. Selección del Solvente para la Lixiviación Selectiva del Ácido Ferúlico

#### 7.3.1. Efecto del pH sobre la Lixiviación del Ácido Ferúlico con Diferentes Solventes

En un primer estudio se empleó un producto deshidratado obtenido de un concentrado de nejayote preparado por nanofiltración (200 Da). Previo al secado, el pH de 2 alícuotas se ajustó a 3 y 6 respectivamente. Los resultados de los productos deshidratados extraídos con solventes de variada polaridad, se presentan en la **Figura 7**.



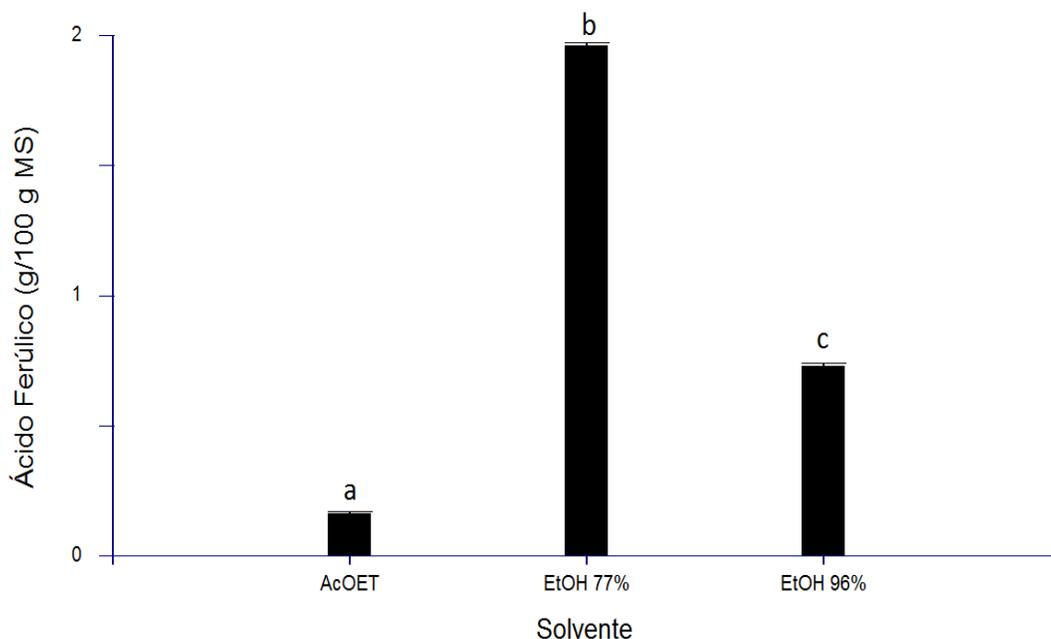
**Figura 7.** Efecto del pH sobre la lixiviación del AF a partir de muestras deshidratadas con solventes de diversa polaridad. Las barras corresponden al valor promedio de la concentración de ácido ferúlico de 3 repeticiones. Líneas en las barras, indican el error estándar. Letras minúsculas o mayúsculas diferentes, indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Se observa que a pH 3, los rendimientos de extracción con los diferentes solventes no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, los rendimientos de extracción a partir de muestras con el pH ajustado a 6 presentaron grandes diferencias. El mayor rendimiento se obtuvo con el EtOH:H<sub>2</sub>O al 65% (v/v) que fue la mezcla con solvente de mayor polaridad, seguido por el EtOH (96% v/v). Los

rendimientos más bajos fueron obtenidos con AcOEt y *n*-Butanol, los solventes menos polares. Este comportamiento es atribuido al cambio en el grado de agregación molecular del AF de acuerdo al pH. A pH 6 estaría parcialmente dissociado al encontrarse en la zona entre su primer y segundo pKa (9.0 y 4.4, respectivamente), con las formas iónicas (ferulato) predominantes que tienen mayor afinidad por solventes polares. A pH 3 prevalecen las formas moleculares del AF al encontrarse el pH muy por abajo del segundo pKa (4.4), las que presentan afinidad, tanto por solventes de alta, como de mediana polaridad.

Este primer resultado permitió correlacionar la importancia del pH del material deshidratado con los procesos de extracción.

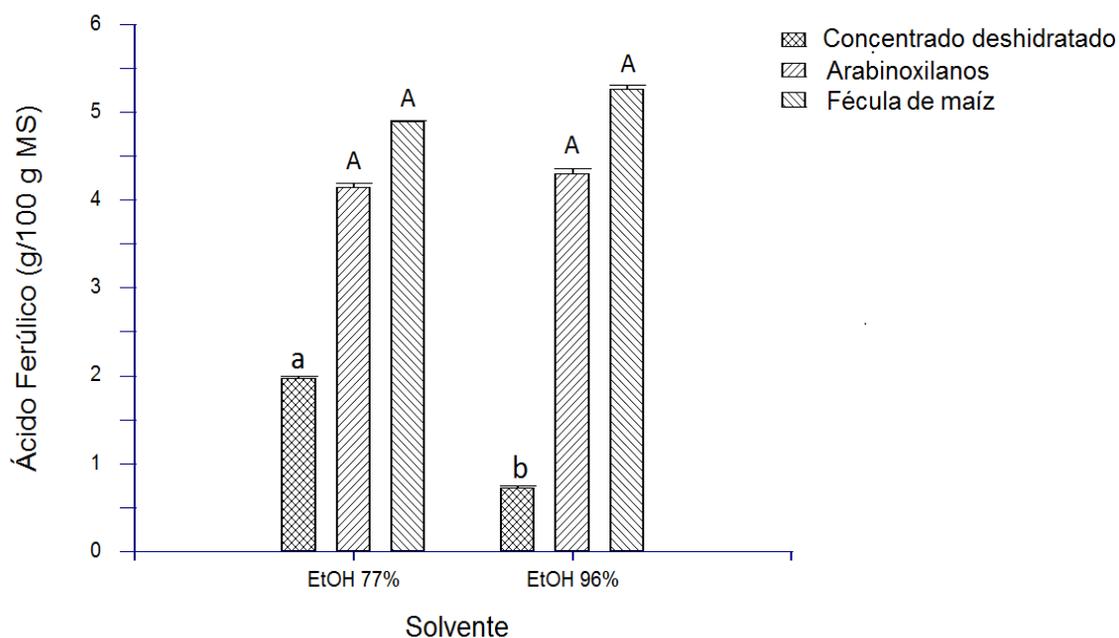
En un segundo estudio se empleó un producto deshidratado resultante de la mezcla de los productos deshidratados obtenidos a escala piloto (alícuotas del mismo peso), a partir de nejayote provisto, tanto por la tortillería, como por la harinera industrial. Este producto, al ser disuelto nuevamente en agua mostró un pH de 4.7. Los resultados de la extracción con tres tipos de solventes se presentan en la **Figura 8**.



**Figura 8.** Extracción con diferentes solventes de un producto (pH en solución 4.7), resultante de la mezcla de los productos deshidratados obtenidos a escala piloto (alícuotas del mismo peso), a partir de nejayote provisto, tanto por la tortillería, como por la harinera industrial. Las barras corresponden al valor promedio de la concentración de ácido ferúlico de 3 repeticiones. Líneas en las barras, indican el error estándar. Letras diferentes, indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

En este experimento, a pH 4.7, nuevamente se observó que el mayor rendimiento de extracción se obtuvo con el solvente de polaridad más alta (etanol 77%), mientras que el más bajo (0.3 g/100 g MS) fue con el solvente menos polar (AcOEt) de los 3 ensayados. Se obtuvo un rendimiento bajo (0.8 g/100 g MS) con EtOH al 96% ya que se conoce que en este solvente, la solubilidad del ácido ferúlico es elevada (O'Neil, 2006; Guo *et al.*, 2003) por lo que este hecho se consideró atípico.

Para estudiar dicho comportamiento atípico, se diseñó un experimento en el que se buscó reproducir la composición del nejayote mediante la mezcla de sus principales constituyentes, formados principalmente por hemicelulosa extraída y purificada del propio nejayote, sales (sulfato de calcio) y compuestos fenólicos (ácido ferúlico). Una segunda modalidad de esta mezcla fue en la que se sustituyó la hemicelulosa por almidón. Las proporciones utilizados para las mezclas fueron un 75% de hemicelulosas o fécula de maíz o, 20% de sulfato de calcio y 5% de ácido ferúlico (estándar). Estas mezclas fueron extraídas únicamente con etanol al 96% y 77% (v/v), con los resultados que se presentan en la **Figura 9**.



**Figura 9.** Efecto sobre la lixiviación del AF con solventes de alta polaridad de muestras formuladas con los principales constituyentes del nejayote y la muestra anteriormente analizada (mezcla de productos de concentrados deshidratados). Las barras corresponden al valor promedio de la concentración de ácido ferúlico de 3 repeticiones. Líneas en las barras indican el error estándar. Letras minúsculas o mayúsculas diferentes, indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Las muestras formuladas, una vez puestas en solución acuosa presentaron pH del orden de 6, el AF fue recuperado en igual proporción con EtOH al 96% (v/v) y EtOH al 77% (v/v). Sin embargo, en la muestra de concentrado deshidratado, la cantidad de ácido ferúlico extraída con EtOH al 77% fue 200% más alta que la obtenida con EtOH al 96%, hecho que demuestra el comportamiento atípico antes mencionado.

Una explicación para este resultado es que en el deshidratado de nejayote existan compuestos que por su naturaleza, son insolubles en etanol solo, pero que sí son solubles en una mezcla de etanol con agua (posiblemente compuestos fenólicos unidos a azúcares). Estos compuestos estarían actuando mediante puentes de hidrógeno o fuerzas de van del Waals con el ácido ferúlico o bien tendrían atrapado físicamente a este compuesto, razón por la cual cuando la extracción se realiza únicamente con etanol se establecería un mecanismo de competencia entre una fase sólida que tiene adsorbido o atrapado al AF y el solvente de extracción. Cuando el solvente utilizado es la mezcla de etanol-agua (EtOH al 77%), tanto los compuestos insolubles en EtOH al 96%, como el AF, se disuelven completamente incrementando considerablemente la concentración en solución de este último.

### 7.3.2. Elección del Solvente para la Lixiviación Selectiva del Ácido Ferúlico

El proceso de nanofiltración/ósmosis inversa utilizado permite retener prácticamente la gran mayoría de los compuestos en solución del nejayote que, según diversos autores, están conformados por una amplia gama de moléculas, entre los que destacan el ácido ferúlico, el ácido *p*-cumárico, azúcares, hemicelulosa y sales inorgánicas entre otros (Asaff, 2013; Gutiérrez-Urbe *et al*, 2010; Niño-Medina *et al.*, 2009; Rosentrater, 2006; Izydorzcyk y Biliaderis, 1995; Pflugfelder *et al.*, 1988). Los productos deshidratados de los concentrados resultantes del proceso de filtración/permeación por membranas, contienen por ende, la gran mayoría de los compuestos anteriormente citados, siendo necesario la elección de solventes que extraigan de manera selectiva el AF en compromiso con un máximo rendimiento de extracción. En la **Tabla 8** se presentan los resultados de la caracterización del deshidratado empleado para las pruebas de elección del solvente.

**Tabla 8.** Caracterización fisicoquímica del producto deshidratado utilizado para las pruebas de elección del solvente.

Parámetro	Contenido (g/100 g MS)
Humedad	1.073 ± 0.01
Cenizas	21.39 ± 0.046
pH	4.38 ± 0.014
Azúcares reductores	14.78 ± 0.177
Fenoles totales*	3.72 ± 0.082
Ácido ferúlico*	2.91 ± 0.081

Los datos expresados son las medias de tres repeticiones ± error estándar. \* Determinados por extracción exhaustiva con EtOH al 77%.

Los valores que se observan en esta **Tabla 8** difieren de los presentados en la **Tabla 6** ya que para partir de un mismo material para las pruebas de lixiviación se realizó una mezcla de los productos deshidratados obtenidos a escala piloto (alícuotas del mismo peso), a partir de nejayote provisto, tanto por la tortillería, como por la harinera industrial.

En la **Tabla 9** se muestran los resultados de selectividad y rendimientos de lixiviación con diferentes solventes del producto deshidratado proveniente del nejayote.

**Tabla 9.** Lixiviación con diferentes solventes de un concentrado deshidratado proveniente del nejayote para la recuperación de AF.

Solvente	Materia total extraída	Ácido ferúlico extraído	Rendimiento*	Selectividad
	g/100 g MS		(%)	(%)
EtOH 96%	7.44 ± 0.13	0.72 ± 0.06	24.74 ± 0.04 <sup>e</sup>	9.7 ± 0.06 <sup>C</sup>
EtOH 77%	40.52 ± 0.46	1.97 ± 0.09	67.70 ± 0.02 <sup>c</sup>	4.9 ± 0.02 <sup>E</sup>
EtOH:HCl (95:1)	31.75 ± 0.28	1.73 ± 0.03	59.45 ± 0.04 <sup>d</sup>	5.4 ± 0.04 <sup>D</sup>
AcOEt	4.34 ± 0.11	0.15 ± 0.02	5.15 ± 0.08 <sup>f</sup>	3.5 ± 0.08 <sup>F</sup>
AcOEt:H <sub>2</sub> O (95:5)	5.50 ± 0.12	2.11 ± 0.03	72.51 ± 0.02 <sup>b</sup>	38.4 ± 0.02 <sup>A</sup>
AcOEt:HCl (95:1)	8.80 ± 0.17	2.44 ± 0.06	83.85 ± 0.07 <sup>a</sup>	27.7 ± 0.07 <sup>B</sup>
<i>n</i> -Butanol	4.42 ± 0.10	0.14 ± 0.02	4.81 ± 0.03 <sup>f</sup>	3.2 ± 0.03 <sup>F</sup>

\*Calculado sobre el contenido máximo de AF reportado en la **Tabla 8**. Los datos expresados son las medias de tres repeticiones ± error estándar. Letras minúsculas o mayúsculas diferentes, indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

Con base a los resultados del efecto del pH en los rendimientos de extracción, se incluyeron como solventes de extracción, algunos que fueron adicionados con HCl.

Primeramente, destacó el hecho que al añadirse HCl al etanol al 96%, la cantidad de ácido ferúlico que fue extraído, prácticamente triplicó a la cantidad extraída con etanol al 96% sin acidificar. Sin embargo, la adición de ácido no solo favoreció la extracción de ácido ferúlico, sino que también la de otros compuestos puesto que la materia total extraída en condiciones ácidas cuadruplicó el valor en desmedro de la selectividad. Este hecho refuerza la hipótesis formulada en el punto anterior en la que se postula que en el deshidratado de nejayote, el ácido ferúlico se encuentra interactuando con otros compuestos afines o se encuentra atrapado físicamente. La adición de HCl, posiblemente cambie también el estado de agregación molecular de otros compuestos, o incluso esté provocando algún tipo de hidrólisis, con lo que se provocaría la disolución de dichos compuestos, conjuntamente la del ácido ferúlico en el etanol al 96% acidificado.

Por otro lado, tal como se observó en los experimentos precedentes, la extracción con EtOH al 77%, produjo un rendimiento elevado de extracción (67%) aunque la cantidad de material total extraído fue la más elevada de todas por lo que la selectividad de dicho solvente fue de las más bajas.

Uno de los aspectos más relevantes fue que el hecho de añadir una pequeña cantidad de agua (5%) al acetato de etilo, incrementó al menos 14 veces su capacidad de extracción del ácido ferúlico, con apenas un incremento del 27% del material total extraído, por lo que la selectividad de dicho solvente fue la más elevada (38.4%). En el caso del acetato de etilo acidificado con HCl, la cantidad de ácido ferúlico recuperado se incrementó 16 veces en relación a la extracción con acetato solo, aunque el material total extraído se incrementó en un 100% por lo que la selectividad se redujo a un 27.7%.

### **7.3.3. Lixiviación del Ácido Ferúlico con CO<sub>2</sub> en Estado Supercrítico**

En la **Tabla 10** se muestran los resultados de la extracción supercrítica de ácido ferúlico a partir de producto resultante de la mezcla de los productos deshidratados

obtenidos a escala piloto (alícuotas del mismo peso), a partir de nejayote provisto, tanto por la tortillería, como por la harinera industrial.

**Tabla 10.** Contenido de AF en los extractos obtenidos concentrado de nejayote deshidratado con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico.

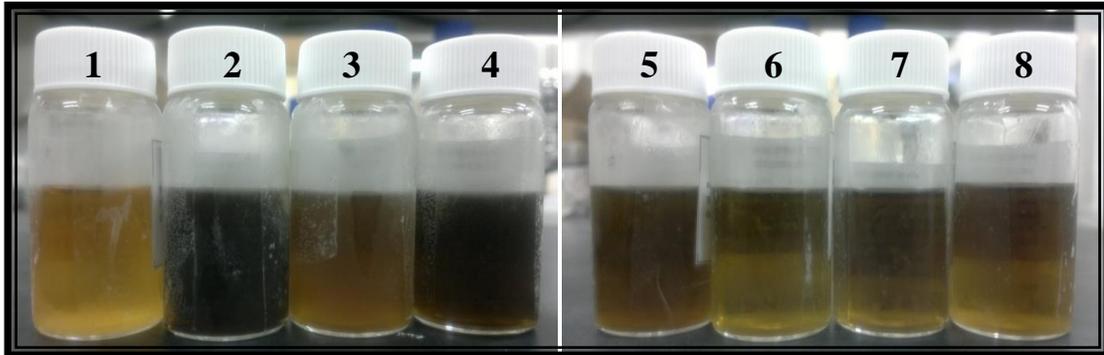
Tratamiento	Materia total extraída	Ácido ferúlico extraído	Rendimiento* (%)	Selectividad (%)
	g/100 g MS			
1. 50°C; 200 Bar y 0% Co-s	0.075 ± 0.08	0.027 ± 0.03	0.9 ± 0.06 <sup>f</sup>	36.00 ± 0.05 <sup>C</sup>
2. 50°C; 200 Bar y 10% Co-s	1.39 ± 0.12	0.72 ± 0.13	24.7 ± 0.02 <sup>a</sup>	51.80 ± 0.06 <sup>A</sup>
3. 45°C; 150 Bar y 5% Co-s	0.49 ± 0.06	0.25 ± 0.02	8.6 ± 0.04 <sup>c</sup>	51.02 ± 0.07 <sup>A</sup>
4. 45°C; 150 Bar y 10% Co-s	0.88 ± 0.03	0.47 ± 0.04	16.2 ± 0.07 <sup>b</sup>	53.41 ± 0.06 <sup>A</sup>
5. 45°C; 250 Bar y 5% Co-s	0.43 ± 0.02	0.21 ± 0.05	7.2 ± 0.05 <sup>c</sup>	48.84 ± 0.02 <sup>B</sup>
6. 55°C; 150 Bar y 5% Co-s	0.58 ± 0.06	0.29 ± 0.04	10 ± 0.03 <sup>c</sup>	50.00 ± 0.07 <sup>A</sup>
7. 55°C; 250 Bar y 5% Co-s	0.34 ± 0.03	0.16 ± 0.02	5.5 ± 0.08 <sup>d</sup>	47.06 ± 0.08 <sup>B</sup>
8. 50°C; 200 Bar y 5% Co-s	0.30 ± 0.08	0.11 ± 0.04	3.8 ± 0.07 <sup>d</sup>	36.67 ± 0.06 <sup>C</sup>

\*Calculado sobre el contenido máximo de AF reportado en la **Tabla 9**. Los datos expresados son las medias de tres repeticiones ± error estándar. Letras minúsculas o mayúsculas diferentes, indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

De acuerdo al diseño experimental desarrollado se infiere que la variable que resulta determinante para el rendimiento de extracción de ácido ferúlico es el co-solvente ya que presión y temperatura apenas modifican las variables de respuesta (rendimiento y selectividad). Es conocido que en la extracción supercrítica, el uso de co-solventes modifica dramáticamente la polaridad del fluido (Murga, 2000). Aunque el rendimiento bajo las condiciones ensayadas fue mínimo, destaca el hecho de la elevada selectividad obtenida con la extracción supercrítica que oscila entre el 36 al 52%. Particularmente destaca el experimento 2, en el que aunque se recuperó tan solo el 25% del AF disponible en la muestra, la selectividad fue cercana al 52%.

En un estudio realizado por Yongyue *et al.* (2006) al determinar la extracción de AF de la raíz *Angelica sinensis* con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico encontró que tanto los rendimientos de extracto y el contenido de AF en los extractos, aumentan a medida que se va aumentando las proporciones de etanol como co-solvente a la materia prima. Los rendimientos de extracto y el contenido de AF aumentan de 111.5 a 170.1% y 140.0 a 160.0%, respectivamente en comparación con CO<sub>2</sub> puro.

Haciendo un análisis cualitativo sobre el color de los extractos obtenidos por el sistema supercrítico del concentrado de nejayote deshidratado, en la **Figura 10** se observa que efectivamente, que al aumentar el porcentaje de co-solvente hay un aumento de coloración, tornándose con una tonalidad más oscura en comparación a los demás extractos. Esta coloración coincide con la cantidad de material extraído siendo los experimentos 2 y 4 en los que se tuvo el mayor rendimiento.



**Figura 10.** Extractos obtenidos por el sistema supercrítico del concentrado de nejayote deshidratado. Condición del experimento: **1)** 50 °C, 200 Bar, 0% Co-S; **2)** 50 °C, 200 Bar, 10% Co-S; **3)** 45 °C, 150 Bar, 5% Co-S; **4)** 45 °C, 150 Bar, 10% Co-S; **5)** 45 °C, 250 Bar, 5% Co-S; **6)** 55 °C, 150 Bar, 5% Co-S; **7)** 55 °C, 250 Bar, 5% Co-S y **8)** 50 °C, 200 Bar, 5% Co-S.

## VIII. CONCLUSIONES

El nejayote tratado por diferentes sistemas de membranas recupera fracciones concentradas conteniendo una buena cantidad de AF. Hay una ligera diferencia del tipo de procedencia del nejayote, dando mayor concentración en procesos de nixtamalización industrial, se considera que esta variabilidad se debe a que en el proceso industrial, las condiciones de nixtamalización se modifican ligeramente de acuerdo a la variedad del maíz utilizado, lo que modifica la cantidad de cal, tiempo de cocción y reposo.

El pH del concentrado hidrolizado, durante su alimentación a los secadores, influye drásticamente en las características fisicoquímicas del producto deshidratado, siendo necesario operar a  $\text{pH} > 4$  para no generar productos adherentes y tener mayor rendimiento y a temperatura de aire de entrada  $< 135$  °C para no tener una degradación del AF.

El concentrado de nejayote deshidratado es estable a la temperatura de 4 y 25 °C durante al menos 120 días de almacenamiento. Pero hay un ligero cambio en la coloración (rosita) del producto. Sin embargo, pese a ese cambio de coloración, sus características fisicoquímica no influyó, dando resultados similares en cuanto al contenido de AF.

Los solventes AcOEt acuoso y AcOEt mínimamente acidificado, lixiviaron con mayor concentración el AF. Sin embargo, el CO<sub>2</sub> en estado supercrítico, con etanol como co-solvente, muestra mayor selectividad al compararse. Por otro lado, la lixiviación del AF con CO<sub>2</sub> resultó con mayor porcentaje de selectividad pero al compararse con las concentraciones del rendimiento de AF con los demás solventes, su eficiencia extractiva es menor.

Si bien, no se realizó un costeo del proceso, los resultados se muestran promisorios para una producción competitiva de AF.

## **IX. RECOMENDACIONES**

- Evaluar la optimización del proceso de secado por aspersión, estudiando otras temperaturas de entradas y salidas del aire para obtener mayor rendimiento del producto deshidratado.
- En el proceso de secado por aspersión a nivel piloto se recomienda aumentar el volumen de muestra a tratar, ya que así no se tendría una mayor pérdida del producto deshidratado con el incrustamiento en las paredes de la cámara de secado debido a que se estaría formando una capa por saturación de la muestra.
- Se recomienda la microencapsulación del nejayote, agregando algún tipo de agente encapsulante (aceites hidrogenados, ceras, maltodextrinas, almidones y gomas) para evitar la caramelización debido a los azúcares presentes.
- Evaluar el método de secado por liofilización, ya que la muestra no pasaría por varios recipientes del quipo como es el caso del secado por aspersión y no se tendría pérdidas considerables del producto.
- Evaluar la optimización sobre el proceso de lixiviación del AF con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico para obtener una mayor concentración de extracción de AF, por ejemplo aumentar la mayor proporción de EtOH como co-solvente.

## X. REFERENCIAS

- Adams R. y Bockstahler T. E. 1952. "Preparation and reaction of hydroxycinnamic acids and esters". *Journal of American Chemical Society*. 74:5346–5348.
- Adom K. y Liu R. 2002. "Antioxidant activity of grains". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:6182-6187.
- Agger J., Johansen K. y Meyer A. 2011. "Enzymatic hydrolysis of corn bran arabinoxylan-theory versus practice". *Doctoral dissertation*, Technical University of Denmark Tekniske University, Department of Systems Biology Institut for Systembiologi. 7-10.
- Almeida D. H. y Millán L. T. 1986. "Aprovechamiento de los sólidos de las aguas residuales de la nixtamalización del maíz". *Gestión tecnológica*. 17-22.
- Amaro D., Acosta J., Hernández N. y Gago A. 1998. *Informe Técnico de Proyecto*. Centro de Química Farmacéutica. OCIC-020/97.
- Amendola D. De Faveri D. y Spigno G. 2010. "Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts". *Journal of Food Engineering*. 97:384-392.
- Asaff T. y Reyes V. 2013. "Un método y un sistema para el tratamiento integral de aguas residuales de una industria del maíz". *Patente Mexicana*. No. MX/a/2013/002096.
- Asaff T., M de la Torre M., y R Macías R. 2008. "Proceso para la recuperación de ácido ferúlico". *Patente Mexicana*. No. MX259521.
- Barbosa G. y Vega H. 2000. "Deshidratación de Alimentos". *Acribia*. España. pp 1-137 y 165-201.
- Balasubashini M., Rukkumani R. y Menon V. 2003. "Protective effects of ferulic acid on hyperlipidemic diabetic rats". *Acta Diabetologica*. 40:118-122.

- Benoit I., Navarro D., Marnet N., Rakotoma nomana N., Lesage-Meessen L., Sigoillot J-C., Asther M., y Asther M. 2006. "Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products". *Carbohydrate Research*. 341:1820-7.
- Bonilla F., Mayen M., Merida J. y Medina M. 1999. "Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants". *Food Chemistry*. 66:209-215.
- Bouchard J., Hguyen T.S., Chornet E. y Overend R.P. 1991. "Analytical methodology for biomass pretreatment. Part 2: Characterization of the filtrates and cumulative product distribution as a function of treatment severity". *Bioresource Technology*. 36:121-131.
- Caballero B., Trugo L. y Finglas M. 2003. "Membrane techniques. Principles of ultrafiltration." *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 6:3837-3848.
- Castillo V., Ochoa M., Figueroa C., Delgado L., Gallegos I. y Morales C. 2009. "Efecto de la concentración de hidróxido de calcio y tiempo de cocción del grano de maíz (*Zea mays L.*) nixtamalizado, sobre las características fisicoquímicas y reológicas del nixtamal". *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 59(4).
- Cavero S., García Risco G.M, Marín F.R, Jaime L., Santoyo S. y Senorans. 2006. "Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano. Chemical and functional characterization via LC-MS and in vitro assays". *Journal of Supercritical Fluids*. 38:62-69.
- Chan M., Rocha S., Lehman M., White S., Santana I. y Nip J. 2004. "Clinical and in vitro investigation of the effects of ferulic acid on human skin pigmentation". *Journal of Investigative Dermatology*, 122, A157-A157.
- Chang C., Chiu J., Tseng L., Chang H., Chien T. y Wu C. 2006. "Modulation of HER2 expression by ferulic acid on human breast cancer MCF7 cells". *European Journal of Clinical Investigation*. 36:588-596.
- Chirinos R., Rogez H., Campos D., Pedreschi R. y Larondelle Y. 2007. "Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz y Pavón) tubers". *Separation and Purification Technology*. 217-225.
- Christine B., Dunford H. y Welinder G. 1995. "Rate enhancement of compound and formation of barley peroxidase by ferulic acid, caffeic acid, and coniferyl alcohol". *Biochemistry*. 34:4022-4029.

- Cork, S. J., & Krockenberger, A. K. 1991. "Methods and pitfalls of extracting condensed tannins and other phenolics from plants: Insights from investigations on Eucalyptus leaves". *Journal of Chemical Ecology*. 17(1):123-134.
- De Vries R.P. y Visser J. 1999. "Regulation of the feruloyl esterase (*faeA*) gene from *Aspergillus niger*". *Applied and Environmental Microbiology*. 65(12):5500–5503.
- Díaz-Reinoso B., Moure A., Domínguez H. y Parajó J. 2006. "Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity". *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 54:2441-469.
- Durling N., Catchpole O., Grey J., Webby R., Mitchell K., Foo L. y Perry N. 2007. "Extraction of phenolic and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures". *Food Chemistry*. 101:1417-1424.
- Faulds C., Williamson G. 1999. "The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall". *Journal Science Food Agriculture*. 79:393-395.
- Fazary A. Y-Hsu Y. 2007. "Feruloyl esterases as biotechnological tools: Current and future perspectives". *Acta Biochimica et Biophysica Sínica*. 39(11):811-828.
- Graf E. 1992. "Antioxidant potential of ferúlico acid". *Free Radical Biology and Medicine*. 13:435-448.
- Gray J.I., Gomaa E.A. y Buckley D.J. 1996. "Oxidative quality and shelf-life of meats". *Meat Science*. 43:S11-S123.
- Gutiérrez-Uribe, J. A., C. Rojas-García, S. García-Lara, and S. O. Serna-Saldívar. 2010. Phytochemical analysis of wastewater (nejayote) obtained after lime-cooking of different types of maize kernels processed into masa for tortillas. *Journal of Cereal Science*. 52:410-416.
- Guo T., Sun Y., Sui Y. y Li F. 2003. "Determination of ferulic acid and adenosine in *Angelicae radix* by micellar electrokinetic chromatography". *Anal. Bioanal. Chem*. 375:840–843.
- Hampe M. 1986. "Selection of solvents in liquid-liquid extraction according to physico-chemical aspects". *German Chemical Engineering*. 9:251-263.

- Herrero M., Cifuentes A. e Ibañez E. 2006. "Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food by products, algae and microalgae". A review. *Food Chemistry*. 98:136-148.
- Hisaji T., Eisaku N., Takuo T., Seiko M., Koji K. y Chieko H. 1994. "Method of manufacturing ferúlico acid". *Patente Americana*. US/a/1994/5288902.
- Hlasiwetz H. y Barth L. 1866. "Mittheilungen aus dem chemischen Laboratorium in Innsbruck I, Ueber einige Harze [Zersetzungsproducte derselben durch schmelzendes Kali]". *Liebig's Annalen der Chemie*. 138:61-76.
- Horváth I. 2008. "Solvents from nature". *Green Chemistry*. 10:1024-1028.
- Ibarz R. y Barbosa C. 2005. "Operaciones unitarias en la ingeniería de los alimentos". Ediciones *MUNDI-PRENSA*. México. pp. 767-814.
- Izydorczyk M. y Biliaderis C. 1995. "Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties". *Carbohydrate Polymers*. 28:33-48.
- Kajimoto T. 1989. "Sesquiterpenoid and disulphide derivatives from *Ferula assa-foetida*". *Phytochemistry*. 28:1761-1763.
- Khanna S. K., Viswanathan P. N., Krishnan P. S. y Sanwal G. G. 1968. "Extraction of total phenolics in the presence of reducing agents". *Phytochemistry*. 7(9):1513-1517.
- Li B., Smith A. y Hossain M. 2006. "Extraction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*. 48:182-188.
- Lin F., Lin J., Gupta R., Tournas J., Burch J. y Selim M. 2005. "Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins C and E and doubles its photoprotection of ski". *The Journal of Investigative Dermatology*. 125:826-832.
- López M.B.E., Carvajal P.L.M. y Millan C.L.J. 2009. "Stablising of the conditions of the blend of pulp with banana (*Musa Paradisiacal L.*) to submit spray drying". *Vitae*, revista de la Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 16(3):287-296.
- Marinova E. y Yanishlieva N. 1997. "Antioxidative activity of extracts from selected species of the family *Lamiaceae* in sunflower oil". *Food Chemistry*. 58:245-248.
- Mattila P. y Hellström J. 2007. "Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products". *Journal of Food Composition and Analysis*. 20(3):152-160.

- Menaker A., Kravets M., Koel M. y Orav A. 2004. "Identification and characterization of supercritical fluids extracts from herbs". *Comptes Rendus Chimie*. 7:629-33.
- Murga R. 2000. "Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol". *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 48:3408-412.
- Mussatto S., Dragone G. y Roberto I. 2007. "Ferulic and *p*-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain". *Industrial Crops and Products*. 25:231-237.
- Nilesh P.N., Soottawat B., y Benjakul B. 2009. "Effect of ferulic acid on inhibition of polyphenoloxidase and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage". *Food Chemistry*. 116:323-33.
- Niño-Medina G., Carvajal-Millán E., Lizardi J., Rascon-Chu A., Marquez-Escalante J., Gardea A., Guerrero V. 2009. "Maize processing waste water arabinoxylans: Gelling capability and cross-linking content". *Food Chemistry*. 115(4):1286-1290.
- Nishizawa C., Ohta T., Egashira Y. y Sanada H. 1998. Ferulic acid contents in typical cereals (in Japanese with abstract in English). *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. 45:499-503.
- Ohnishi M., Matuo T., Tsuno T., Hosoda A., Nomura E. y Taniguchi H. 2004. "Antioxidant activity and hypoglycemic effect of ferulic acid in STZ-induced diabetic mice and KK-Ay mice". *Biofactors*. 21:315-319.
- O'Neil M. 2006. "The Merck Index-An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals". *Merck and Co., Inc., Ed.14*, 692.
- Ono K., Hirohata M. y Yamada M. 2005. "Ferulic acid destabilizes preformed beta-amyloid fibrils in vitro". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 336:444-449.
- Ou S.Y., Luo Y.F., Xue C., Huang N., Zhang Z. y Liu Z. 2007. "Separation and purification of ferulic acid in alkaline-hydrolysate from sugarcane bagasse by activated charcoal adsorption/anion macroporous resin exchange chromatography". *Journal of Food Engineering*. 78:1298-1304.
- Ou-Shiyi Y. y Kin-Chor K. 2004. "Review. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods". *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84:1261-1269.

- Palmieri G., Bonacucina G., Di Martino P. y Martelli S. 2002. "Gastro-resistant microspheres containing ketoprofen". *Journal of Microencapsulation*. 19:111-119.
- Peña T. 2014. "Efecto de la suplementación de ácido ferúlico y ferulato de etilo en el comportamiento productivo y calidad de la carne de bovinos". Maestría en Ciencias. *Tesis de Maestría en Ciencias*, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, México.
- Pflugfelder R., Rooney L. y Waniska R. 1988. "Dry matter losses in commercial corn masa production". *Cereal Chemistry*. 65(2):127-132.
- Poole C. 2004. "Chromatographic and spectroscopic methods for the determination of solvent properties of room temperature ionic liquids". *Journal of Chromatography A*. 1037:49-82.
- Price R. K., Welch R. W., Lee-Manion A. M., Bradbury I. y Strain J. J. 2008. "Total phenolics and antioxidant potential in plasma and urine of humans after consumption of wheat bran". *Cereal Chemistry*. 85(2):152-157.
- Pringle T.D., Calkins C. R., Koohmaraie M. y Jones S. J. 1993. "Effects over Lambs on Muscle Time of Feeding a  $\beta$ -Adrenergic Agonist to Wether Animal Performance, Muscle Growth, Endogenous Proteinase Activities, and Meat Tenderness". *Journal of Animal Science*. 71(3):636-644.
- Reyes-Vidal Y., Aceves-Diez A., Martínez-Silva A. y Asaff-Torres A. 2013. "Proyectos de investigación, desarrollo tecnológico e innovación para el cuidado y reúso del agua". *Revista de Estudios Sociales*. Vol.20, Segundo Núm. Especial, Marzo de 2012.
- Rojas-García C., García-Lara S., Serna-Saldivar S. y Gutiérrez-Urbe J. 2012. "Chemopreventive Effects of Free and Bound Phenolics Associated to Steep Waters (Nejayote) Obtained After Nixtamalization of Different Maize Types". *Plant Foods for Human Nutrition*. 67:94-9
- Rosentrater K. A. 2002. "Developing reuse alternatives of corn masa processing by product streams". ASAE Annual International Meeting/CIGR XVth World Congress, Chicago, Illinois, USA, American Society of Agricultural and Biological Engineer.
- Rosentrater K. A. 2006. "A review of corn masa processing residues: Generation properties and potential utilization". *Waste Management*. 26:284-292.

- Rosentrater K. A. 2004. "Analysis of factors affecting corn masa byproduct generation". Annual International Meeting Sponsored by ASAE/CSAE Ottawa, Ontario, Canada, St. Joseph, Michigan.
- Saija A., Tomaino A., Trombetta D., De Pasquale A., Uccella N., Barbuzzi T., Paolino D y Bonina F. 2000. "In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents". *International Journal of Pharmaceutics*. 199:39-47.
- Serna-Saldivar S., Gomez M. y Rooney L. 1990. "Technology, chemistry, and nutritional value of alkaline-cooked corn products". *Advances in Cereal Science and Technology*. 10:243-307.
- Sharapin N., L. Machado, E.M. Souza, E. Rocha de Albuquerque, E. Valverde y J.M. López. 2000. *Fundamentos de Tecnología de Productos fitoterapéuticos*. Convenio Andrés Bello y Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Colombia. pp:17.
- Suzuki A., Yamamoto M., Jokura H., Fujii A., Tokimitsu I., Hase T. y Saito I. 2007. "Ferulic acid restores endothelium-dependent vasodilation in aortas of spontaneously hypertensive rats". *Journal of the American Society of Hypertension*. 20:508-513.
- Torres-Zapata T. y Ullan V. 2011. "Aplicación de una nueva FAE en la liberación químico-enzimática de ácido ferúlico a partir de pulpa de remolacha". *Ciencias Agronómicas*. 12:021-025.
- Valderrama-Bravo C., Gutiérrez-Cortez E., Contreras-Padilla M., Rojas-Molina I., Mosquera J.C., Rojas-Molina A., Beristain F. y Rodríguez-García M.E. 2012. "Constant pressure filtration of lime water (nejayote) used to cook kernels". *Journal of Food Engineering*. 110:478-486.
- Vásquez L. 2008. "Extracción con fluidos supercríticos y síntesis enzimática para la obtención de lípidos funcionales". *Tesis de Doctorado*, Universidad Autónoma de Madrid.
- Velazco M., Angulo O. y Vázquez C. 1997. "Effect of dried solids of nejayote on broiler growth". *Poultry Science*. 76:1531-1534.
- Viniegra-González G. y Ramírez-Romero M.A.G. 2007. "Proceso de utilización del nejayote". México. *Patente Mexicana*. MX/A/2007/010310.
- Wang B. y Ou-Yang J. 2005. "Pharmacological actions of sodium ferulate in cardiovascular system". *Cardiovascular Drug Reviews*. 23:161-172.

- Yilmaz E. E., Özvural E. y Vural H. 2011. "Extraction and identification of proanthocyanidins from grape seed (*Vitis Vinifera*) using supercritical carbon dioxide". *The Journal of Supercritical Fluids*. 55(3):924-928.
- Yongyue S., Shufen L., Huiting S. y Songjiang T. 2006. "Extraction of ferulic acid from *Angelica sinensis* with supercritical CO<sub>2</sub>". *Natural Product Research*. 20:835-841.
- Zalacain A. 2001. "Estudios de extractos tánicos obtenidos a partir de hoja de zumaque (*Rhus coriaria L.*)". *Tesis de Doctorado*. Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal de la Universidad Castilla-La Mancha. Albacete, España.